



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA

**VALOR PREDICTIVO DE LA PROTEÍNA
RELACIONADA CON EL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I (MIC) EN LA
RESPUESTA OVÁRICA Y EN LA INMUNOLOGÍA
DE LA IMPLANTACIÓN**

TESIS DOCTORAL

ISABEL SANTILLÁN PALENCIA

Madrid 2011

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA
**HOSPITAL UNIVERSITARIO MADRID-
MONTEPRINCIPE**
GINEFIV
HOSPITAL LA PAZ

VALOR PREDICTIVO DE LA PROTEÍNA
RELACIONADA CON EL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I (MIC) EN LA
RESPUESTA OVÁRICA Y EN LA INMUNOLOGÍA DE
LA IMPLANTACIÓN

MEMORIA

Presentada para optar al grado de doctor por la UAM por

Isabel Santillán Palencia

Madrid 2011

DIRECTOR: **Jose Manuel BAJO ARENAS**, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CO-DIRECTOR: **Isidoro BRUNA CATALÁN**, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Departamento de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Madrid-Montepríncipe.

CERTIFICAN: Que Doña Isabel Santillán Palencia ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral: “ **VALOR PREDICTIVO DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I (MIC) EN LA RESPUESTA OVÁRICA Y EN LA INMUNOLOGÍA DE LA IMPLANTACIÓN**”, necesaria para optar al grado de Doctor en Medicina. Revisado el presente trabajo, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 30 de Julio de 2011

EL DIRECTOR DE LA TESIS

EL CODIRECTOR DE LA TESIS

Fdo: Jose Manuel Bajo Arenas

Fdo: Isidoro Bruna Catalán

“Mi padre me enseñó que el razonamiento lógico y el método científico son las bases del desarrollo de nuestra sociedad. Sin su constante apoyo y continua motivación este trabajo no habría visto la luz. Su fe en mí como médico y persona fueron siempre imperturbables. Por ello le dedico esta tesis con el mayor cariño del mundo.”

In memoriam

AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor Doctor Don **Jose Manuel Bajo Arenas**, Director de esta tesis, por estimular el interés académico de nuestro equipo y su apoyo en esta tesis

Al Profesor Doctor **Isidoro Bruna Catalán**, codirector de esta tesis, por su ayuda imprescindible en la puesta en marcha del Proyecto de Investigación así como su continua supervisión.

A la Profesora Doctora **M^a Carmen Cuadrado Mangas**, Jefe de Servicio de Reproducción Humana del Hospital Universitario “La Paz” por despertar en mí el interés por la Reproducción Asistida y encaminar la atención hacia la investigación.

A los Doctor Profesor Don **Juan Ángel Jover Jover**, al Doctor Profesor Don **Udo Markert**, al Doctor Don **Benjamín Fernández Gutiérrez**, y muy especialmente al Doctor Don **José Ramón Lamas López** por su apoyo científico, colaboración y supervisión en el análisis de las muestras.

A todo el equipo de **GINEFIV**, en especial a los embriólogos, por su ayuda en la recogida de muestras.

A la Doctora Doña **Victoria Verdú Merino**, a **Luis Español Bajo** y a todas mis compañeras por su apoyo y comprensión durante este largo camino.

A Doña **Belén San José Valiente** por su participación en el análisis estadístico

A mi **hija**, mi **madre**, mi **marido** y mi **hermano** absolutamente por todo.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas.....	1
1. Introducción:.....	4
1.1. Importancia del problema.....	5
1.2. Antecedentes de investigación.....	7
1.3. Definiciones.....	9
1.4. Estado actual del problema.....	21
2. Hipótesis y Objetivos:.....	34
2.1. Hipótesis de trabajo.....	35
2.2. Objetivos.....	37
3. Material y Métodos.....	40
3.1. Problemas de Investigación.....	41
3.2. Justificación de la investigación y de la metodología.....	46
3.3. Protocolo de investigación.....	48
3.4. Análisis estadístico.....	60
4. Resultados:.....	62
a. Estudio descriptivo:.....	63
b. Estudio analítico:.....	69
1. Relación entre expresión de MIC y tipo de tratamiento.....	69
2. Relación entre la edad y tipo de tratamiento.....	69
3. Relación entre tipo de tratamiento y tasas de embarazo.....	72
4. MIC y reserva ovárica.....	73
5. MIC y niveles de estradiol.....	81
6. MIC y edad de la paciente.....	83
7. MIC y etiología de infertilidad.....	84
8. Valor predictivo de gestación.....	86
9. MIC y calidad embrionaria.....	89
10. MIC y embriones por ciclo.....	90
11. MIC y proteómica del líquido folicular.....	93
5. Discusión.....	106
1. Existencia de MIC en el líquido folicular.....	107
2. Expresión sérica de MIC.....	108
3. MIC y técnicas de reproducción asistida.....	109
4. MIC en el sobrenadante de cultivo embrionario.....	110
5. MIC y la reserva ovárica.....	112
6. Relación entre MIC folicular y los niveles de estradiol.....	114
7. MIC sérica y la etiología de la infertilidad.....	116

8. MIC e implantación.....	118
9. MIC folicular y calidad embrionaria.....	119
10. MIC y proteómica folicular.....	120
11. Otras asociaciones de la proteómica folicular.....	121
12. MIC en la inmunología folicular.....	123
13. Polimorfismo de MIC.....	126
14. Implicaciones jurídicas y éticas.....	127
6. Conclusiones.....	131
7. Apéndice.....	134
8. Bibliografía.....	145

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BMP: *bone morphogenetic protein*

CEACAM: *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*

CSF: *colony stimulating factor*

DGP: diagnóstico genético implantacional

EGF: *epidermal growth factor*

ELISA: *enzyme –linked immunoabsorbent assay*

E: especificidad

FIV: fecundación in vitro

FSH: *follicle stimulating hormone*

GnRH: *gonadotropin releasing hormone*

HB-EGF: *heparin-binding EGF like growth factor*

β -hCG: *β subunit of human chorionic gonadotropin*

HLA: *human leukocyte antigen*

ICSI: *intracytoplasmatic sperm injection*

IGF-BP: *insulin like growth factor binding protein*

IL: interleuquina

kD: kiloDalton

LH: *luteinizing hormone*

LIF: *Leukemia inhibitory factor*

MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*

mg: miligramo

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MHC: *major histocompatibility complex*

MICA/B: *major histocompatibility complex class I related chain A/B*

ml: mililitro

μl: microlitro

MMP-9: *matrix metalloproteinase*

NCAM: *neural cell adhesion molecule*

NK: *natural killer*

NKG2D: *natural killer group 2D*

oTP: *ovine trophoblastic protein*

PCAM: *Platelet/endothelial cell adhesion molecule*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pg: picogramos

RAE-1: retinoic acid early inducible-1 gene

ROC: *receiver operating characteristic*

S: sensibilidad

SELDI-TOF: *surface enhanced laser desorption ionization time of flight*

TCR: *T cell receptor*

TGF β: *transforming Growth Factor β*

UI: unidades internacionales

ULBP: *union ligand binding protein*

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del problema

La infertilidad es un problema creciente en nuestra sociedad. La prevalencia de la infertilidad se sitúa en torno al 14%. Ello supone que aproximadamente una de cada siete parejas en edad de reproducción presentará problemas para tener descendencia [1]. En el mundo, más de 70 millones de parejas sufren problemas de infertilidad [2]. Esto es así porque la especie humana es poco fértil. En parejas fértiles, incluso en condiciones clínicas óptimas, la posibilidad de un embarazo clínico por ciclo se sitúa entre el 30 y 40%. En casos de inseminaciones de mujeres jóvenes con semen de donante, la tasa de gestación no supera el 40%. Cada vez se señala más la pérdida gestacional preclínica como causa de esta baja fertilidad observada en humanos. Se estima que un 30% de las gestaciones espontáneas se pierde preimplantacionalmente y otro 30% postimplantación. Parece que esto es debido a una importante selección natural ya que el 91% de los embriones tienen alteraciones cromosómicas en el momento de la concepción, mientras que sólo el 0,6% de los recién nacidos las presentan. Sin embargo, en las gestaciones conseguidas por FIV se observa un 50% de fallo preimplantacional y un 15% de postimplantacional. Se desconoce si esto es debido a un defecto de la selección embrionaria o al proceso intrínseco del procedimiento, pero entre el 65-70% de los embriones transferidos no se implantan, constatándose un déficit de técnicas para detectar las causas [3].

El objetivo de los tratamientos de reproducción se define, parafraseando el vocablo anglosajón "BESST" (Birth Emphazasing a Succesfull Singleton at Term), que enfatiza como objetivo primario «el nacido a término procedente de un embarazo único obtenido

por cada ciclo de reproducción asistida» [4]. Pero para conseguir un recién nacido sano, es necesario seleccionar aquellos ovocitos y, sobre todo, aquellos embriones con más posibilidades de implantación, para de esta manera intentar evitar en la medida de lo posible el fallo implantacional, las gestaciones múltiples y el excedente de embriones. Sin embargo, los criterios de selección embrionaria que se vienen utilizando hasta el momento son fundamentalmente morfológicos y aunque exhaustivos, resultan insuficientes a la hora de determinar qué embrión va a dar lugar a un recién nacido en casa. En segundo lugar, el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) tiene fundamentalmente dos inconvenientes. Por una parte es una técnica muy invasiva, y por la gran frecuencia de mosaicismos que detecta, hace que su fiabilidad no sea suficiente para su aplicación clínica sistemática. Parece por tanto necesario buscar nuevos métodos de screening preimplantacional no invasivos. Por otra parte, los principales mecanismos inmunológicos implicados en la implantación son aún motivo de investigación. Las células embrionarias, al poseer HLA paterno son semialogénicas y deberían desencadenar una respuesta inmune de rechazo. Esto no sólo no es así, si no que la madre prepara un lugar con un perfecto equilibrio inmunológico que es imprescindible para el establecimiento de la gestación [5]. La mejor comprensión de estos mecanismos de tolerancia inmunológica, que con frecuencia han sido infraestimados en los problemas de infertilidad, podría ayudar a mejorar el rendimiento de las Técnicas de Reproducción Asistida.

1.2. Antecedentes de investigación

Hasta el momento, ha habido muchas moléculas que se han intentado relacionar con la implantación embrionaria y los resultados de FIV. Entre ellas tenemos: diversas citoquinas, interferon γ , serpinas, VEGF y TNF. Algunas como el HLA-G soluble incluso se han relacionado con las tasas de implantación y la calidad embrionaria [6]. Sin embargo, y a pesar de las más de 2000 muestras analizadas, los resultados continúan siendo controvertidos, y ninguna molécula ha demostrado utilidad clínica a la hora de seleccionar ovocitos, embriones o de predecir resultados de FIV.

MIC o MICA/B (Major histocompatibility complex I change related molecules A/B) son proteínas altamente polimórficas de unos 62KDalton cuyos genes se encuentran dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el cromosoma 6. Al contrario que otras moléculas de histocompatibilidad, MIC no se unen a péptidos ni a la β 2-microglobulina [7]. MIC se expresa de forma constitutiva en endotelio, fibroblastos [8], epitelio intestinal [9] [10] y linfocitos [11], pero puede ser sobre-expresada por el estrés [12], como ocurre en el daño o shock térmico [13], infecciones virales [14] y bacterianas [15], tumores, enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La expresión de MIC se ha descrito en células infectadas por el VHC [16], enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa [17], mieloma múltiple [18], leucemia [19], melanoma y carcinomas epiteliales como el de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata y colon [20].

La unión del MIC de membrana a su receptor el NKG2D en presencia de la proteína DAP-10 desencadena una respuesta citolítica y la secreción de citoquinas [21]. Sin embargo, la forma soluble de MIC induce la endocitosis de NKG2D bloqueando la

respuesta inmunológica. Esto ha sido propuesto como un mecanismo que usan los tumores de evadir el sistema inmunológico [22]. Se ha discutido mucho cual era el origen del MIC soluble, pero parece claro que se produce por liberación proteolítica del MIC de membrana por las enzimas metaloproteasas [23].

Un mecanismo similar ha sido descrito para la inmunotolerancia materno fetal. Se ha encontrado MIC en el sincitiotrofoblasto desde el primer trimestre [24]. MIC se libera en microvesículas llamadas exosomas [25] desde la superficie apical al espacio intercelular. Mincheva-Nilson [24] observó que los niveles de MIC son significativamente más altos en mujeres gestantes. También encontró que los NKG2D de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) están disminuidos en la gestación y que en cultivos celulares, el suero de mujer gestante es capaz de inhibir la actividad citolítica de las Natural Killer. Sin embargo, este efecto se contrarresta cuando al suero se le añaden anticuerpos anti-MIC [24]. Por todo lo expuesto parece que MIC podría jugar un importante papel en la invasión trofoblástica y en el establecimiento de la inmunotolerancia materno fetal. Sin embargo, una reciente publicación pone de manifiesto que la elevación de los niveles de MIC previos a la estimulación ovárica, se relacionan con fallos implantacionales y mayor tasa de abortos [26]. Estos resultados resultan inesperados tras las aportaciones de Mincheva-Nilson [24], y dejan el papel de MIC en la implantación bajo controversia.

1.3. Definiciones:

1. MICA. Cuando hablamos de MICA nos referimos realmente a MICA/B o simplemente MIC. MICA/B representa las siglas del inglés: *major histocompatibility complex class I Change related molecules A/B* [27]. El MHC o Complejo Mayor de Histocompatibilidad es una región genómica que se encuentra en la mayor parte de los vertebrados [28]. Las proteínas codificadas por el MHC se sitúan en la superficie de la membrana celular y son tanto proteínas propias que sirven para el reconocimiento de células propias por el sistema inmune o para la detección de proteínas extrañas que son presentadas a las células T y a otras células inmunes desencadenando el rechazo inmunológico frente a células extrañas, alteradas o infectadas por microorganismos [27]. En el ser humano el MHC se encuentra en el cromosoma 6 [28] y está formado por tres regiones:

- a) MHC clase I: codifica proteínas que se expresan en casi todas las células. Contiene una cadena alfa compuesta por 3 dominios: alfa 1, alfa 2 y alfa 3 que se unen de forma no covalente a la beta2microglobulina (**figura 1**). Presentan antígenos a los linfocitos T CD8 y a las *Natural Killer*. También codifican proteínas relacionadas con el procesamiento antigénico como TAP y tapasina.

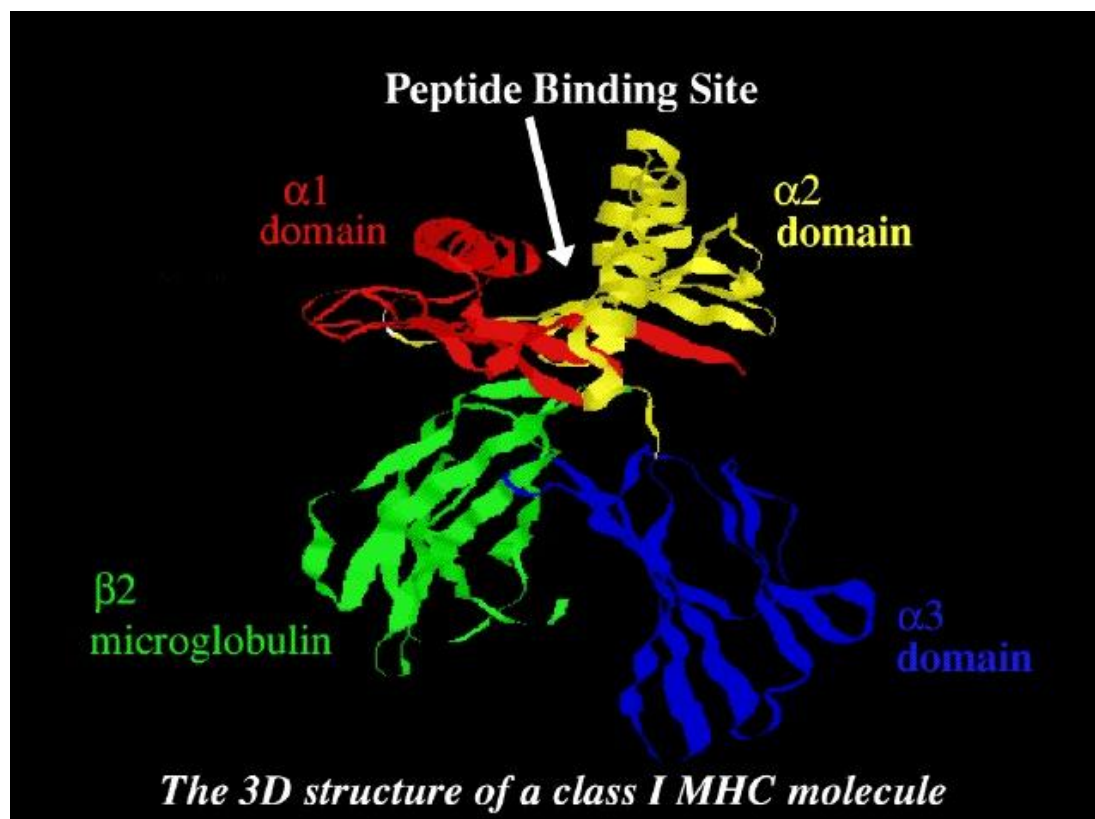
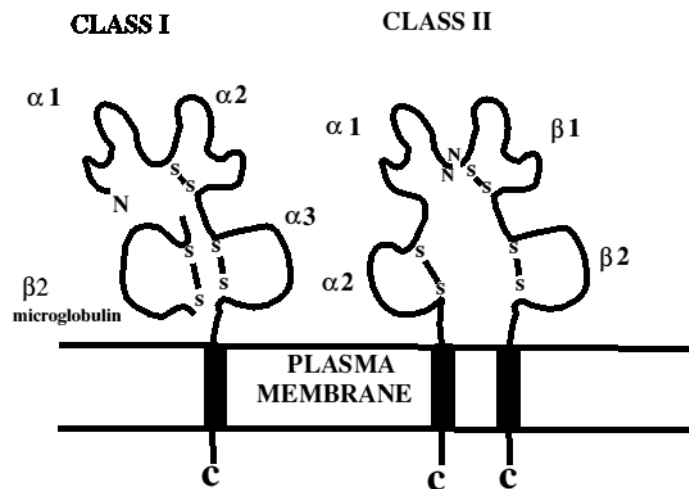


Figura 1 [29]: estructura terciaria de las moléculas de MHC I. Está formada por 3 cadenas α que se unen de forma no covalente a la $\beta 2$ microglobulina. Entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se sitúa el lugar de unión a péptidos. MIC sería similar pero sin unión a $\beta 2$ microglobulina ni a péptidos. MHC de clase II tendría 2 dominios α y 2 β

- b) MHC clase II: codifica proteínas que se expresan fundamentalmente en las células inmunes, especialmente en las células presentadoras de antígenos o APC (Antigen Presenting Cells). Presentan antígenos a los linfocitos T CD8. Se las relaciona con la enfermedad de injerto contra huesped [30]. Su estructura es similar a MHC clase I pero presenta dos dominios alfa y dos dominios beta.
- c) MHC clase III: codifica algunos componentes del complemento, algunas citoquinas y HSP (proteínas de daño térmico o heat shock proteins) [29].

MIC es por tanto, una molécula relacionada con las proteínas codificadas por el MHC clase I, pero a diferencia de estas, no se une a péptidos ni a la $\beta 2$ -microglobulina [31]. MIC serían por tanto moléculas de HLA no clásico. Ambas se codifican dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el cromosoma 6 (**figura 2**). MICA/B o MIC es una proteína de 62KDa. MICA y MICB comparten el 84,3% de la secuencia de aminoácidos y son altamente polimórficas. Los anticuerpos utilizados para su detección reconocen un epítipo común MICA/B [32] y por ELISA no se puede distinguir MICA de MICB [24]. De este modo, de forma general, cuando nos referimos a MICA en realidad nos referimos a MICs, incluyendo MICA, MICB y todas las isoformas de estos.

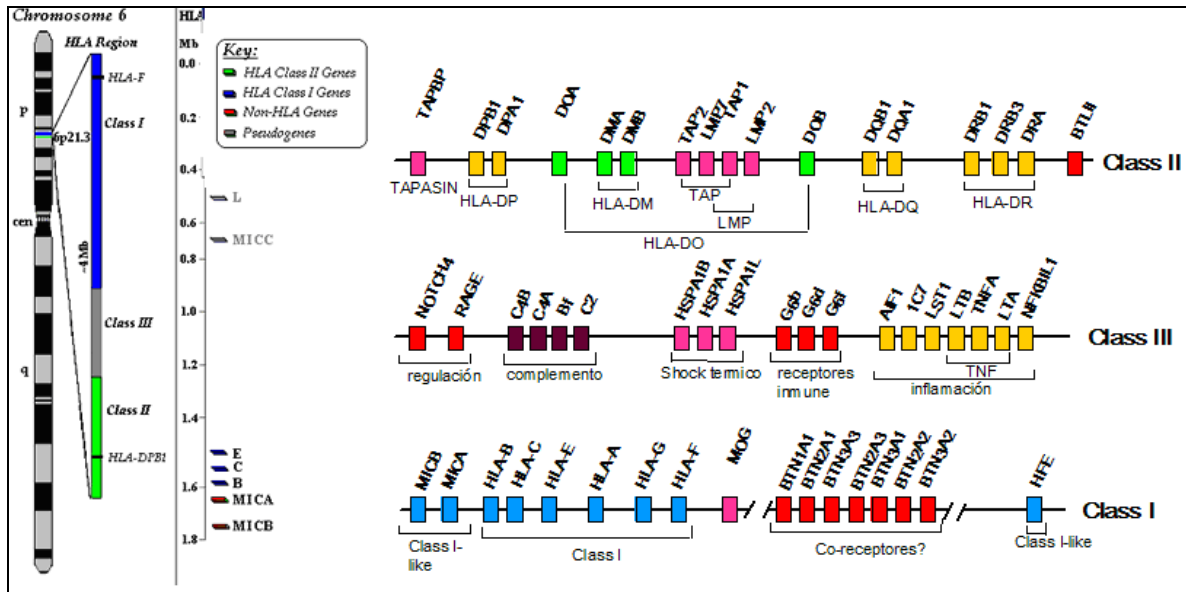
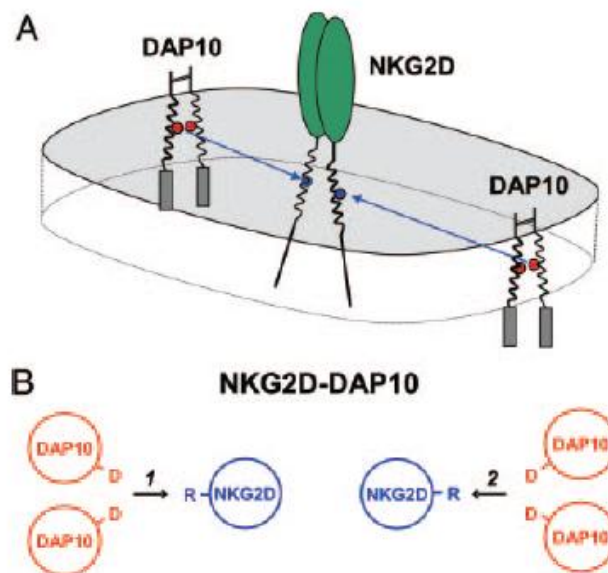


Figura 2. [20][21]: MICA y MICB se sintetizan dentro del complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6.

2. **NKG2D**: Receptor transmembrana situado en células Natural Killer (NK) y otras células inmunes. En la respuesta inmune innata mediada por las Natural Killer, actúa como el primer receptor activador y la unión de sus ligandos desencadena una respuesta citolítica y la liberación de citoquinas. Este receptor también es expresado en las células T CD8. Proporciona importantes señales coestimuladoras en la respuesta inmune adaptativa mediada por las células T amplificando la proliferación de células T y la producción de citoquinas [33].

Entre los ligandos capaces de activar el NKG2D se encuentran: MICA/B, Proteínas de unión a UL (UL binding proteins o ULBP), RAE-1 y H60. El homodímero de NKG2D se une a MICA/B con orientación diagonal sobre los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del MICA/B. De este modo cada monómero contacta con una alfa hélice. Este tipo de

orientación no se produce con el resto de los ligandos [34]. Para que el receptor NKG2D pueda desencadenar una señal es necesaria su asociación a la proteína DAP-10. Esta es un dímero (unido por un puente disulfuro) con un par de residuos de ácido aspártico próximo a los dominios transmembrana que se une a la arginina del dominio transmembrana de NKG2D [35]. Cuando cada monómero de NKG2D se une al dímero de DAP-10 se forma una estructura hexagonal que recuerda al complejo formado por el receptor de las células T TCR y las CD3 (**figura 3**). Cuando se forma este complejo hexagonal, dominios intracitoplasmáticos de DAP-10 se unen a la fosfatidilinositol kinasa 3 desencadenando la estimulación de células T y la liberación de citoquinas (**figura 4**) [36, 37].



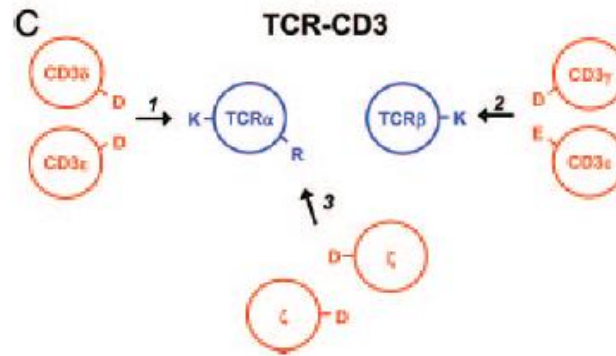


Figura 3. [35]: Cuando el receptor NKG2D se une a DAP-10, forma una estructura hexagonal similar a la del TCR con las CD3

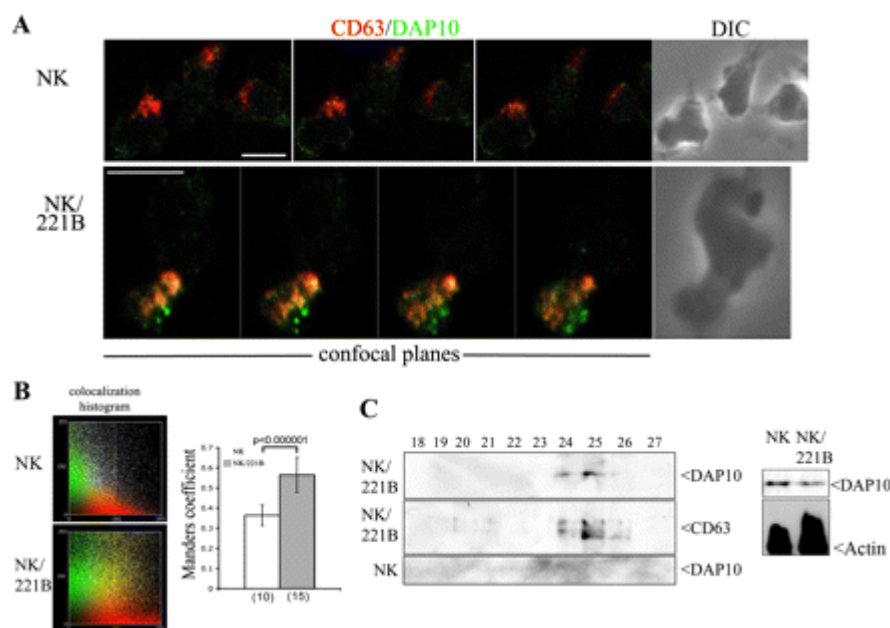


Figura 4 [36]: MIC al unirse a su receptor NKG2D en presencia de la proteína DAP-10, desencadena una respuesta inmune citolítica y la liberación de citoquinas.

3. Pinópodos: Son pequeñas profusiones digitiformes del endometrio (**figura 5**)

inducidos por el aumento de los niveles de estrógenos que aparecen a los 5-7 días

postfertilización, sólo duran 2 o 3 días, durante la ventana implantacional y son fundamentales en la aposición embrionaria [37].

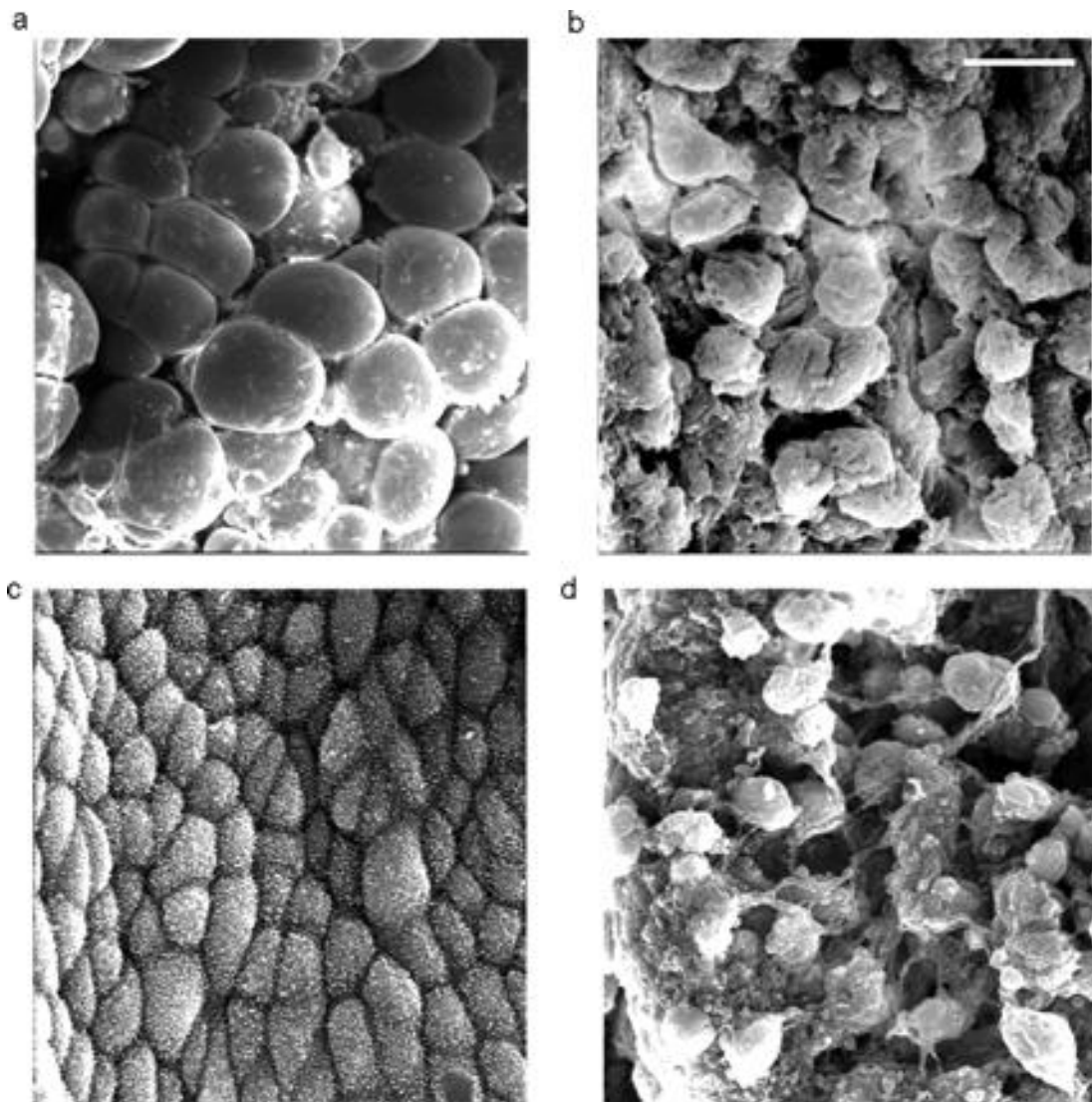


Figura 5 [37]: los pinópodos son protusiones digitiformes del endometrio que aparecen durante la ventana implantacional

4. Ventana Implantacional. Para que se produzca la implantación debe existir una perfecta sincronización entre la receptividad uterina y el embrión. La implantación sólo puede producirse en un periodo muy concreto llamado, ventana implantacional. Fuera de ésta el embrión es rechazado [39]. Paradójicamente, las gestaciones

extrauterinas pueden ocurrir prácticamente en cualquier sitio, lo que pone en duda que existan unos requerimientos inmunológicos específicos de ningún órgano para la implantación embrionaria fuera del útero. Según esto, el útero sería el único órgano refractario a la implantación embrionaria fuera de esta ventana implantacional. Sin embargo, estudios recientes sugieren lo contrario.

5. Immunología de la gestación extrauterina. Se ha sugerido que los procesos inflamatorios de las trompas, bien por infecciones crónicas o por transferencia inadecuada en el caso de las Técnicas de Reproducción Asistida, alteraría el patrón de secreción de citoquinas de modo que el epitelio tubárico competiría con el uterino en cuanto a secreción de citoquinas y moléculas de adhesión, y el embrión migraría a las trompas [40]. Otros estudios sugieren que en las trompas de Falopio también existiría una ventana implantacional. Se ha visto que el sistema de la IL-1 varía a lo largo del ciclo. IL-1 β y IL-1Rt se expresan tanto en epitelio proliferativo como en el secretor aunque en mayor medida en el epitelio secretor. IL-1Rt sólo se expresa en el epitelio secretor. IL-1 β no se expresa en el epitelio tubárico de mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, esta diferencia temporal en la secreción de citoquinas no se acompaña de una diferenciación espacial y no se han encontrado diferencias en el sistema de la IL-1 entre las porciones fimbria, ístmica o ampular de la trompa [41]. Esto sugiere una influencia hormonal sobre la receptividad de los tejidos donde se puede implantar el embrión tanto dentro como fuera del útero. Tradicionalmente existía consenso respecto a que la migración y acumulación de células Natural Killer en el periodo peri-implantacional era una condición sine qua non para la adhesión e implantación embrionaria y que este patrón de NK se encontraba alterado en las gestaciones extrauterinas y en fallos implantacionales [42]. Sin embargo, otros estudios no encuentran diferencias en cuanto al recuento de Natural Killer entre gestaciones que

llegan a término, fallos implantacionales, abortos o gestaciones extrauterinas [43].

También se ha visto que este reclutamiento decidual de NK se produce tanto en gestaciones intrauterinas como extrauterinas y que depende más de factores hormonales que de la presencia de un embrión implantacional [44].

6. Etapas de la implantación embrionaria: El embrión está en la cavidad uterina aproximadamente 72 horas antes de implantarse. Parece que esto se debe a la acción de la glicoproteína de membrana MUC-1 que impide la implantación antes, relacionándose con la receptividad endometrial y la ventana de implantación [45]. La implantación se produce 7 días postfertilización y consta de las siguientes etapas:

- I. Eclosión: por lisis de la membrana pelúcida en el polo embrionario que se va a implantar. En esta parece jugar un papel fundamental la plasmina uterina [46].
- II. Aposición: del polo más celular del embrión en zonas crípticas del endometrio buscando la mayor superficie de contacto (**figura 6**). Los pinópodos al ser proyecciones digitiformes, aumentarían también la superficie de contacto [37].

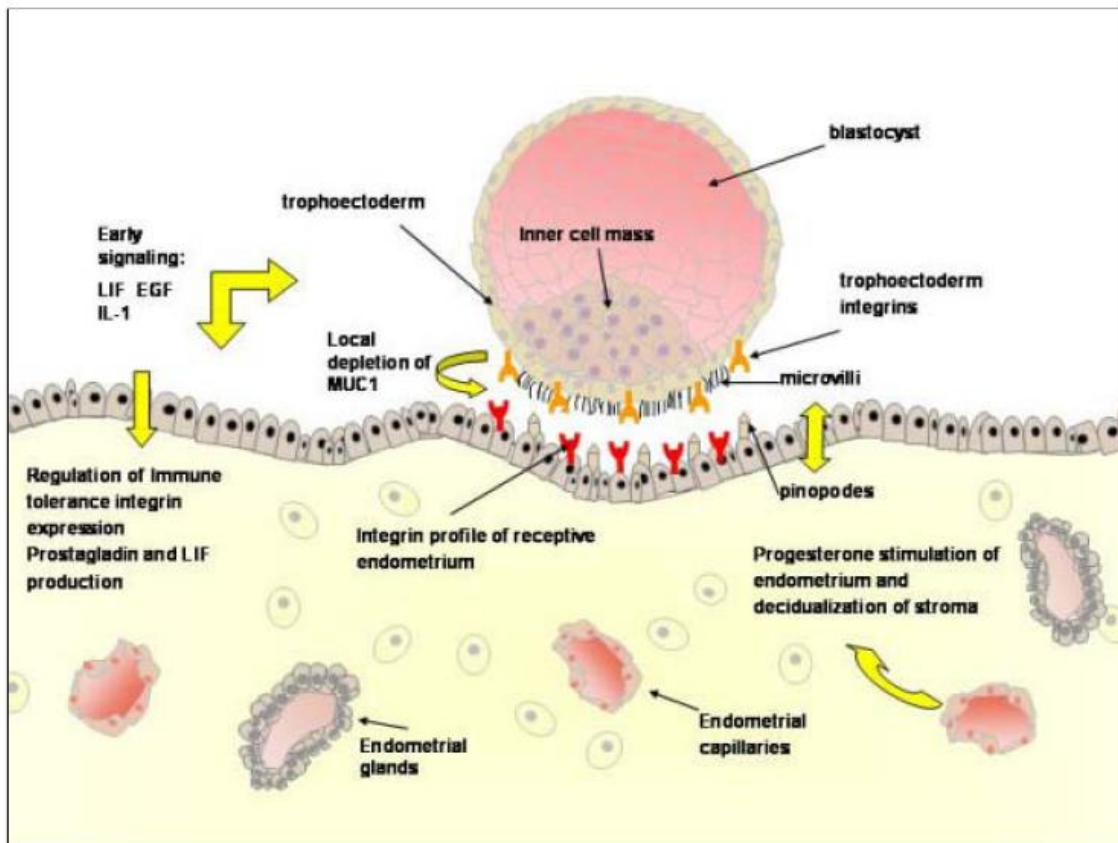


Figura 6 [46]: moléculas implicadas en la aposición embrionaria

III. Adhesión: el embrión se fija al útero a través de las siguientes moléculas de adhesión:

- a) Proteoglicanos: como perlecan y sydecán-1 del blastocisto que se fijan a receptores específicos en el endometrio [47].
- b) Integrinas $\alpha\beta$: son glicoproteínas heterodiméricas transmembrana del trofoblasto que actúan como receptores específicos de moléculas de adhesión en el endometrio. Entre estas estarían las cadherinas y selectinas y otras proteínas de la matriz extracelular como: colágeno, fibronectina, laminina y vitronectina. Parece, por ejemplo, que el embrión se une selectivamente a la E-selectina presente en la superficie de los pinópodos [48].

IV. Invasión: cuando el sinciotrofoblasto entra en contacto con la sangre materna forma las vellosidades coriónicas (**figura 7**) que son precursoras de la placenta. Para esto es necesario separación de células deciduales y lisis del material extracelular [46].

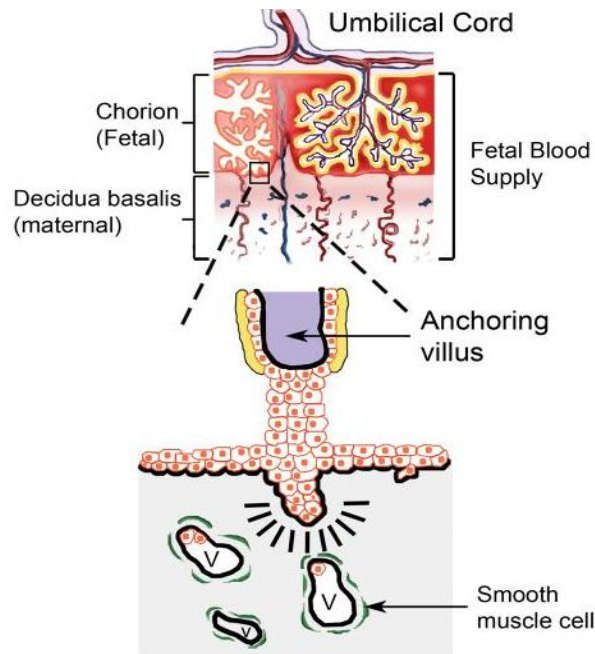


Figura 10 [46]: las vellosidades coriónicas del sinciotrofoblasto entran en contacto con la sangre materna durante la invasión embrionaria

En este proceso intervienen:

- a. Proteasas que lisan material extracelular: endopeptidasas y metaloproteasas como colagenasas, gelatinasas y estromelisina MMPs [49].
- b. Sustancias inmunosupresoras que eviten el rechazo del embrión por el sistema immune materno como el Factor Activador de Plaquetas, hCG, EPF, prostaglandina E2, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), interferon alfa (INF- α), Factor Inhibidor de Leucemia (LIF). Aquí también se encontrarían MIC y HLA-G.

- c. Factores tróficos que faciliten la proliferación de células embrionarias. Algunas de las anteriores y factores de crecimiento como IGF-I, IGFBP, Factor Estimulador de Colonias (CSF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar al epidérmico fijador de heparina (HB-EGF) [51].
- d. Factores angiogénicos que aumenta la vascularización a ese nivel: VCAM, PECAM, NCAM, CEACAM [52].
- e. Factores hormonales: hCG, progesterona, hormona liberadora de corticotropina (CRH) [53] (figura 8).

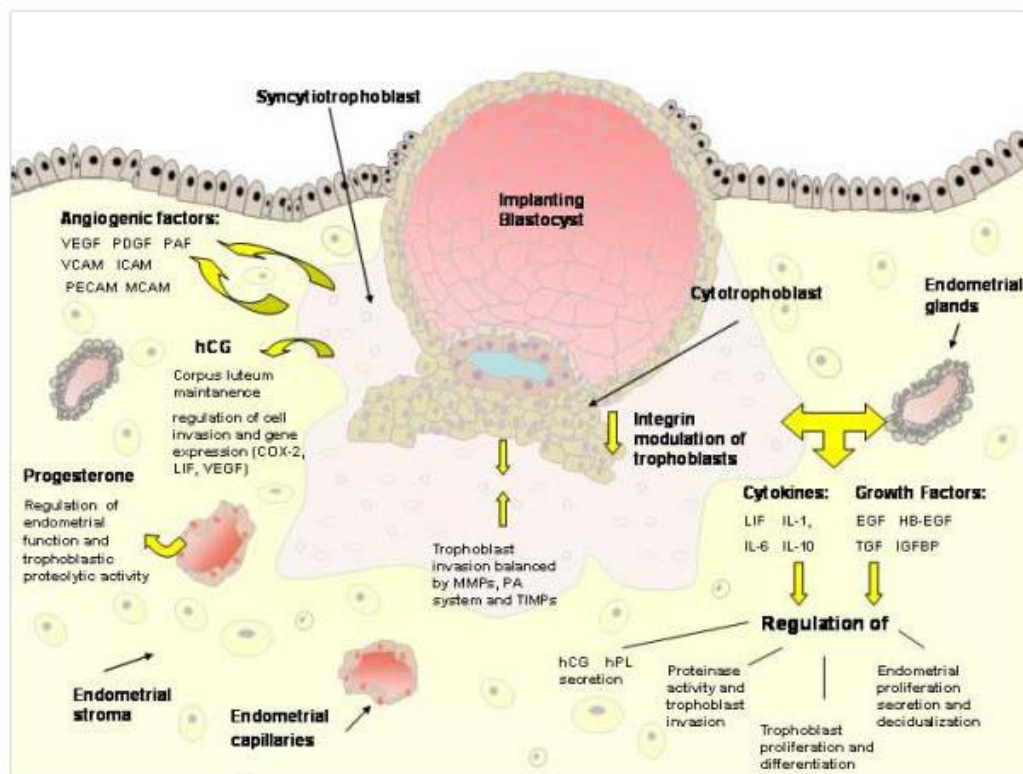


Figura 8 [46]: moléculas implicadas en la adhesión embrionaria.

1.4. Estado actual del problema:

a) Disciplinas Relacionadas: Otros intentos de screening

bioquímico preimplantacional:

Los espectaculares resultados con el empleo de óvulos de donantes dan al embrión un papel protagonista en la implantación embrionaria. En el diálogo embrión-endometrio y el desarrollo de inmunotolerancia materno-fetal parece fundamental la capacidad inmunomoduladora del embrión. Por ello se han investigado un sin fin de moléculas que, sintetizadas por el embrión, fuesen capaces de silenciar el sistema inmunológico de la madre permitiendo la implantación embrionaria y el posterior mantenimiento del embarazo. Los primeros intentos se llevaron a cabo con citoquinas como el LIF [50], que producido por el sinciotrofoblasto, inhibirían la actividad de enzimas endometriales protegiendo al embrión de ser destruido en su implantación.

Puesto que el supuesto rechazo inmune del embrión se debería en principio a la expresión de MHC (Complejo mayor de Histocompatibilidad) paterno y por tanto distinto al de la madre, se investigaron en segundo lugar moléculas relacionadas con el MHC. Algunos autores encontraron que la expresión de HLA-G en el sobrenadante de cultivo embrionario se relacionaba con las tasas de implantación y sugirieron que el HLA-G podría ser un marcador no invasivo de calidad embrionaria [54]. Sin embargo estos resultados no han sido reproducibles por muchos autores [55]. Entre las causas de esta discrepancia se aduce el gran polimorfismo de HLA- G [56] y la escasa sensibilidad

de las técnicas de detección. En este contexto, surge una nueva molécula, MICA/B ó MIC que influye en la invasividad tumoral y en el rechazo a transplantes por desencadenar la actividad citolítica de las Natural Killer al unirse a su receptor NKG2D [57]. Su descripción en sinciotrofoblasto y sus niveles elevados en mujeres gestantes [24] abren paso a nuevas posibles hipótesis que ayuden a entender el complejo proceso de la inmunotolerancia materno-fetal.

Con el fin de mejorar el rendimiento de las Técnicas de Reproducción Asistida, se han buscado numerosas moléculas que pudieran tener relación con los resultados de FIV y servir como screening bioquímico preimplantacional. Entre ellas destacan las citoquinas embrionarias. Desde el EPF (Early Pregnancy Factor) [58], se han descrito múltiples moléculas teóricamente secretadas por el embrión con capacidades inmunosupresoras, pero el papel de ninguna de estas ha sido confirmado. Sin embargo, la producción de citoquinas por el embrión está bien documentada desde la etapa de pronucleo. En este sentido, las más importantes son la IL-1 y el LIF. En ratas cuyo sistema implantatorio está retardado se ha podido estudiar la influencia hormonal sobre esta producción de citoquinas, y se ha comprobado que hasta que no se produce elevación en los niveles de progesterona, el embrión no comienza a expresarlas.

I. LIF es expresado por el endometrio, pero además, tanto LIF como su receptor son secretados por el sinciotrofoblasto y por el embrión preimplantacional. La síntesis de LIF estaría estimulada por la hCG a través de la prokineticina-1[59]. Existen tres isoformas de LIF, pero sólo la soluble parece estar implicada en la implantación. En el citotrofoblasto, LIF inhibe la actividad gelatinasa con lo que aumenta la invasividad del mismo. Favorece el desarrollo de células embrionarias y la supervivencia de células endometriales. También se ha relacionado con la creación de inmunotolerancia mediante la regulación de HLA-G [47]. Parece que LIF es secretado

por células de la granulosa, células estromales y células inmunes. En la fase lútea favorece la producción de folículos primarios a partir de primordiales. En secreciones uterinas la cantidad de LIF es mayor en mujeres fértiles que en las infértiles o con fallos implantacionales. Sin embargo, la administración de LIF en mujeres con fallos implantacionales no ha conseguido aumentar las tasas de implantación [60]. La concentración de LIF en el líquido folicular se ha relacionado la calidad ovocitaria y embrionaria encontrándose en menores cantidades en el ovario poliquístico. Sin embargo, la mayoría de los estudios no han podido relacionar los niveles de LIF con las tasas de embarazo. Sin embargo, Serafín sí encontró que las pacientes con la proteína claudina 4 negativa y LIF positivo presentaban mayores tasas de implantación ($p=0,003$) [61].

II. La IL-1 y su receptor también son expresados por el blastocisto y el sinciotrofoblasto además de por el endometrio. Parece que es una de las primeras señales del blastocisto sobre el endometrio. In Vitro, la IL-1 aumenta la secreción endometrial de prostaglandina E2, LIF y la subunidad $\alpha 3$ de integrinas. En ratones, la administración de antagonistas del receptor de IL-1 disminuye significativamente el número de embriones implantados. La IL-1 también puede estimular la actividad MMP-9 del trofoblasto y su expresión en células del estroma endometrial, induciendo así la invasión trofoblástica [47]. Parece que existe una asociación positiva entre los niveles de estradiol y los de IL-1, pero aquí los resultados también son paradójicos: se asocia con mayor tasa de fertilización de los ovocitos pero no con la calidad embrionaria o con tasas de implantación [62].

III. Interferon τ . El mantenimiento del cuerpo lúteo se produce en primates por la secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG) que bloquea la luteolisis, sin embargo, en especies ovinas y bovinas no existe secreción de hCG y se encontró

que existía una molécula equivalente: la Proteína Trofoblástica ovina (oTP). Al secuenciar la molécula se vio que estaba muy relacionada con el interferon α y se la denominó interferon τ , molécula muy conservada entre especies, y que a diferencia del interferon γ que es abortivo a altas dosis, este no tiene propiedades citotóxicas ni citostáticas para el trofoblasto que de hecho lo sintetiza. A diferencia del interferon γ e incluso del interferon α , que requieren activación celular, la secreción del interferón τ está programada durante el periodo periimplantacional de desarrollo embrionario [63]. En cuanto a sus propiedades inmunorreguladoras, en modelos murinos se ha visto que previene el aborto y aumenta las tasas de implantación a través de señales a los linfocitos Th2 a quienes induce a la secreción de citoquinas. También se ha comprobado que su administración oral resulta beneficiosa en el tratamiento de la encefalopatía autoinmune y que posee propiedades antivirales excelentes incluso frente al HIV [64]. Sin embargo, en humanos, aunque se han descrito moléculas equivalentes, no se ha confirmado [48].

b. Moléculas relacionadas con MHC: HLA-G.

La estructura molecular de HLA-G es similar a otras moléculas de MHC y está formada por una cadena pesada que comprende 3 dominios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ que está unida de forma no covalente a la $\beta 2$ microglobulina [65]. Parece que la función de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es unirse a antígenos peptídicos, mientras que $\alpha 3$ se uniría a correceptores. HLA-G es capaz de unirse a través de la $\beta 2$ microglobulina y del dominio $\alpha 3$ al receptor leucocitario LIR-1 y LIR- 2 y parece que también a receptores inhibidores de los NK como el NKAT-3, evitando la activación del sistema inmunológico [66]. Distintos estudios han propuesto la producción de sHLA-G embrionaria como un indicador de las posibilidades de éxito de FIV [67]. Desde las primeras investigaciones en el año 2002, se han analizado más de 2000 sobrenadantes de cultivo embrionario con resultados contradictorios. En los años 80 se creía que sólo las células de la granulosa eran capaces de sintetizar HLA-I. La primera evidencia de la expresión de HLA-G embrionaria y preimplantacional fue de Jurisicova en 1996 [68]. Según este autor, los embriones con mRNA de HLA-G detectable presentaban mayor número de blastómeras y mayores tasas de implantación. El primer estudio no invasivo fue realizado en 1999 por Meniccuci, quien encontró HLA-I en el 90% de los sobrenadantes de cultivo de mórula [69]. Fuzzi fue el primero en detectar HLA-G en sobrenadante de cultivo embrionario. En una muestra de 285 sobrenadantes encontró que sólo se producía implantación cuando el ELISA con el anticuerpo MEM-G9/anti $\beta 2$ microglobulina MoAb detectaba HLA-G1 o 5 [54]. Más importante aún fueron los estudios prospectivos Noci con 66 mujeres (**figura 9**) [70] y sobre todo de Sher con 482

mujeres, quienes también utilizando este anticuerpo llegaron a similares conclusiones [71].

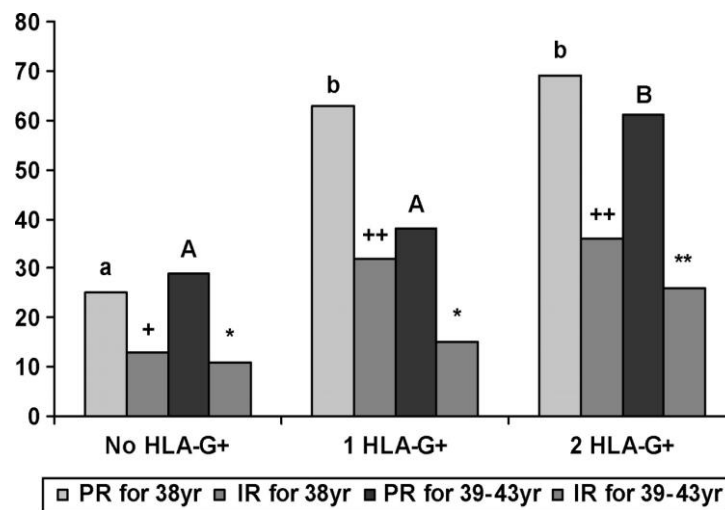


Figura 9 [70]: Las pacientes con HLA-G en al menos un sobrenadante de cultivo embrionario tuvieron mayores tasas de implantación y gestación.

Posteriormente comenzaron a aparecer trabajos de otros grupos, como el de van Lierop, en el que no se detectaba HLA-G en el sobrenadante de cultivo embrionario iniciándose la controversia [55]. El escaso volumen de las muestras y la heterogeneidad de las técnicas de ELISA empleadas suponía un problema. En este sentido, parece que el anticuerpo monoclonal MEM-G9/anti beta2microglobulina era el más sensible. Van Lierop utilizó el anticuerpo monoclonal G233 y 56B por lo que podría sugerirse que con estos anticuerpos no se detectaba HLA-G. Sagheshima realizó un nuevo estudio en el que utilizó distintos anticuerpos incluido el MEM-G9 y tampoco encontró HLA-G en ellos [72]. Sin embargo, utilizó volúmenes de aproximadamente 200µl de sobrenadante de cultivo embrionario por embrión, por lo que podría pensarse que las muestras estaban muy diluidas para la escasa cantidad de HLA-G que es esperable encontrar. Los resultados en cualquier caso reactivaban la controversia.

El problema de la escasa sensibilidad del ELISA en la detección de HLA-G es aparentemente solventada por Rebman a través de la tecnología de Luminex, que mediante amplificación con microesferas permite detectar HLA-G en muestras de tan sólo 10µl en 1,5 horas. En 2007 Rizzo vuelve a asegurar que existe HLA-G, no sólo en el sobrenadante de cultivo embrionario, sino también en el líquido folicular y describe una relación entre ellos [74]. El HLA-G del líquido folicular es el doble que en plasma. Distintos estudios han demostrado que en estadios iniciales del ovocito fecundado, la transcripción está silenciada y que la activación del genoma embrionario empieza en el embrión entre 4 y 8 células a las 70 horas postfecundación [75]. Esto hace pensar que la síntesis de HLA-G ovocitaria resulta muy importante en el sobrenadante de cultivo embrionario y que la detección de HLA-G soluble en el líquido folicular podría ser una alternativa interesante para la selección ovocitaria [74]. La selección ovocitaria supone una alternativa prometedora ya que ayudaría a solventar el problema ético del exceso de embriones y la selección embrionaria. No podemos olvidar que en países como Italia y Alemania la legislación es más restrictiva a este respecto. Sin embargo, en la reunión organizada por EMBIC en Junio de 2008 sobre HLA-G y en la que tuve el honor de participar, la controversia continua, y tampoco HLA-G parece tener utilidad clínica a la hora de seleccionar embriones u ovocitos.

c. Disciplina inmediata: Inmunología de MIC. ¿Tiene valor pronóstico en FIV?

1. Natural Killer e implantación. La acción de MIC se debe a la unión de esta a su receptor NKG2D presente fundamentalmente en células Natural Killer (NK) y en algunos linfocitos T [22]. Las células Natural Killer son fundamentales para la implantación embrionaria. Son capaces de sintetizar citoquinas necesarias para la angiogénesis, el desarrollo placentario y el establecimiento de la gestación. Sin embargo un número elevado de células natural killer uterinas se relaciona con fallos implantacionales [76]. Las células Natural Killer uterinas tienen un patrón fenotípico especial: CD56brightCD16dim (CD56 fuerte y CD16débil) [77]. Durante la implantación embrionaria y las primeras fases de la placentación existe un aumento de las mismas que está inducido por la hCG a través del receptor de manosa MR, CD206 [78].
2. Regulación de la expresión de MIC. MIC se expresa de forma constitutiva en células endoteliales, fibroblastos, epitelio intestinal y células dendríticas y especialmente en la serie mielomonocítica, sobre todo linfocitos. Las células Natural Killer poseen dos tipos de receptores: activadores e inhibidores [18]. Los KIR son receptores que se inhiben cuando se les une una célula con la molécula MHC-I porque se reconoce como célula propia. Si la célula no presenta MHC-I propio se desencadena la respuesta inmune. El propio receptor desencadena esta respuesta inmune [79]. El receptor NKG2D sin embargo, es un receptor activador que se activa con la unión de sus ligandos. Se ha descrito que los ligandos de NKG2D, incluido MIC, surgen de células dañadas y desencadenan una respuesta inmune frente a dichas células, pero curiosamente también se expresan de

forma constitutiva en las células previamente mencionadas: linfocitos, fibroblastos, epitelio digestivo...etc [80]. Parece que en estos casos la activación del sistema inmune estaría controlada porque existe una importante regulación de su expresión. Tantos factores transcripcionales como el ORF como microRNA se unirían a determinadas secuencias conservadas de MIC reduciendo su expresión. Esto evitaría el desencadenamiento de la respuesta inmune frente a células sanas. Parece que este mecanismo de autocontrol se perdería en células tumorales o dañadas [81]. MIC se sobre expresa en condiciones de estrés celular como el daño térmico, infecciones virales, tumores, enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La alteración del complejo mayor de histocompatibilidad I en la alopecia areata está descrita desde 1994 [82]. Se ha descrito expresión de MIC en células infectada por el virus de la hepatitis C [16], en la enfermedad de Crohn [83], en la colitis ulcerosa [17, 80], mieloma múltiple [18], leucemias [19], melanoma, cáncer de pulmón, de mama, ovario, próstata y cáncer de colon [20]. En estos casos, la expresión de MIC supone un mecanismo de defensa de modo que el sistema inmune eliminaría células dañadas. Sin embargo, expresión de determinadas isoformas de MIC por parte de las células infectadas por el citomegalovirus, sería uno de los factores que cronificarían la infección [85]. Por tanto, la expresión de MIC no siempre alerta el sistema inmune.

3. Escape inmunológico: La unión del MIC de membrana a su receptor el NKG2D en presencia de la proteína DAP 10, desencadena actividad citolítica y secreción de citoquinas [86]. Sin embargo, la unión de MIC soluble silenciaría el sistema inmunológico. Parece que esta forma soluble produce una regulación a la baja de los receptores NKG2D y que este sería un mecanismo que algunos tumores utilizan para escapar del sistema inmunológico del huésped [22]. Al unirse MIC soluble a NKG2D se produciría una endocitosis de estos receptores [24].

Tamaki encontró que en aquellos pacientes con carcinoma oral escamocelular que presentaban niveles de MIC <50 pg/ml presentaban una supervivencia significativamente mayor que cuando MIC fué > de 50 pg/ml [22]. Se ha discutido mucho cual era el origen de esta forma soluble, pero según las últimas investigaciones realizadas por Waldhauer, el MIC soluble procede de la liberación del MIC de membrana por enzimas metaloproteasas [23]. Por otra parte se ha visto que la producción de proteasas es muy importante en la implantación embrionaria. El citotrofoblasto secreta una increíble cantidad de metaloproteasas. Algunas son específicas del primer trimestre y otras se secretan durante todo el embarazo. En concreto MMP-2, MT2-MMP, TIMP-2 y TIMP-3 se asocian a un fenotipo especialmente invasivo y a su vez las metaloproteasas secretadas por el trofoblasto regulan la secreción de las metaloproteasas deciduales [87]. Parece por tanto, que la secreción de metaloproteasas por parte del embrión no sólo contribuye a la lisis de la matriz extracelular sino también a la inmunomodulación de MIC en la implantación.

4. MIC embrionario. Al igual que MIC soluble parece contribuir a la invasión tumoral [22], MIC embrionario ayudaría a la invasión trofoblástica contribuyendo a la inmunotolerancia maternofoetal [24]. Se ha descrito MIC en el sinciotrofoblasto desde el primer trimestre. Por microscopía electrónica se observó que MIC se sitúa en vacuolas citoplásmicas de unas 2µm que a su vez contienen pequeñas microvesículas granulares de MIC de 60 nm que se distribuyen fundamentalmente a nivel apical, basal y en el Golgi. Las vacuolas de MIC migrarían desde la parte basal de la célula al polo apical donde al fusionarse con la membrana celular liberarían las microvesículas de MIC al espacio maternofoetal (**figura 10**) [24]

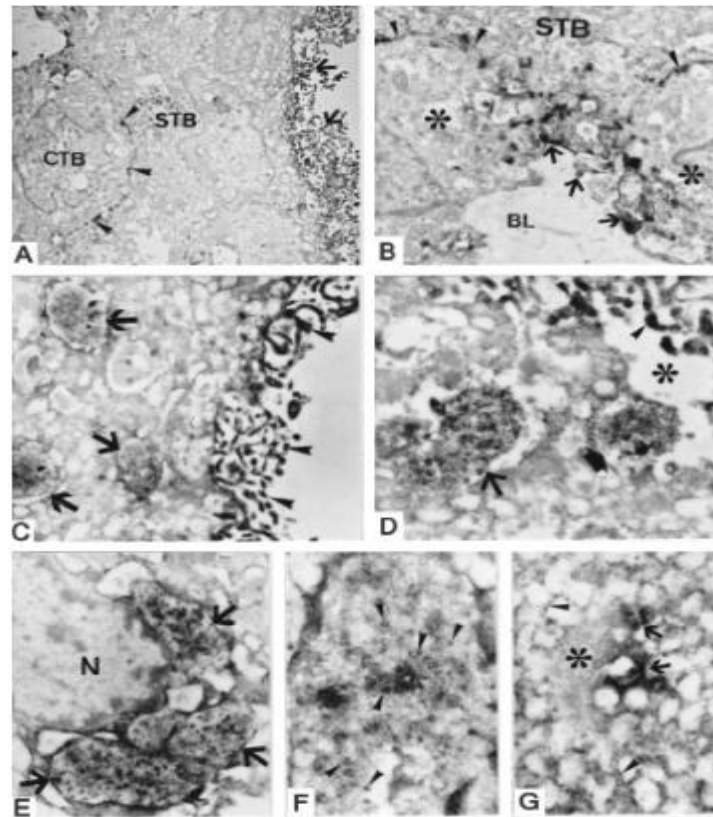


Figura 10 [24]: MIC se expresa en microvesículas en la superficie apical del sinciotrofoblasto.

Estudios posteriores no han podido confirmar la existencia de MIC trofoblástica [65], pero Mincheva-Nilson observó que los niveles plasmáticos de MIC eran significativamente mayores en mujeres embarazadas y que en estas los receptores NKG2D de los PBMC (Células Mononucleares de Sangre Periférica) estaban disminuidos. También observó que en cultivos celulares con suero de mujer gestante la actividad citolítica de las Natural Killer estaba inhibida y que esta actividad citolítica se recuperaba añadiendo anticuerpos anti-MIC (**figura 11**). De acuerdo con estos datos, MIC juega un papel fundamental en invasión trofoblástica y previene el rechazo inmunológico de la madre hacia el feto [24].

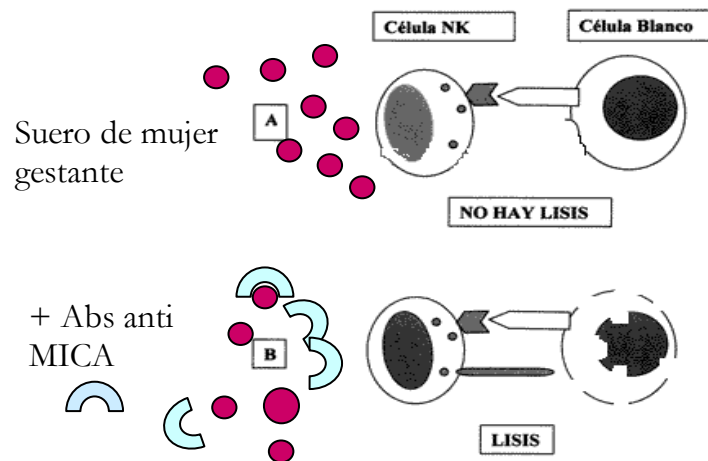


Figura 11: los anticuerpos anti-MIC bloquean el efecto inmunosupresor del suero de mujer gestante

5. Valor predictivo en la implantación. Parece lógico pensar que si MIC es importante en la implantación embrionaria, su determinación tenga un valor pronóstico de los resultados de FIV. También parece evidente que si MIC contribuye a la inmunotolerancia maternofoetal, mayores niveles de MIC se asocien a mayores tasas de gestación. Sin embargo, en el estudio de Porcú-Buisson se describe todo lo contrario. Los niveles de MIC en plasma en mujeres que posteriormente conseguían gestación era significativamente más bajo (2,5ng/ml frente a 12ng/ml) que en aquellas que no lo conseguían. A su vez, en las mujeres que conseguían gestación, los niveles de MIC fueron significativamente más altos (11,12ng/ml versus 2,18 ng/ml) en aquellas en las que se produjeron abortos (**figura 12**). Es importante señalar que las determinaciones de MIC en este estudio se hicieron antes de empezar la estimulación ovárica de las pacientes [26]. Estos resultados, aunque paradójicos, son los únicos que sepamos se han publicado relacionando niveles de MIC y la implantación y al igual que ha sucedido con otras moléculas con las que se ha

intentado el diagnóstico bioquímico preimplantacional, sitúan el papel de MIC en la implantación bajo controversia.

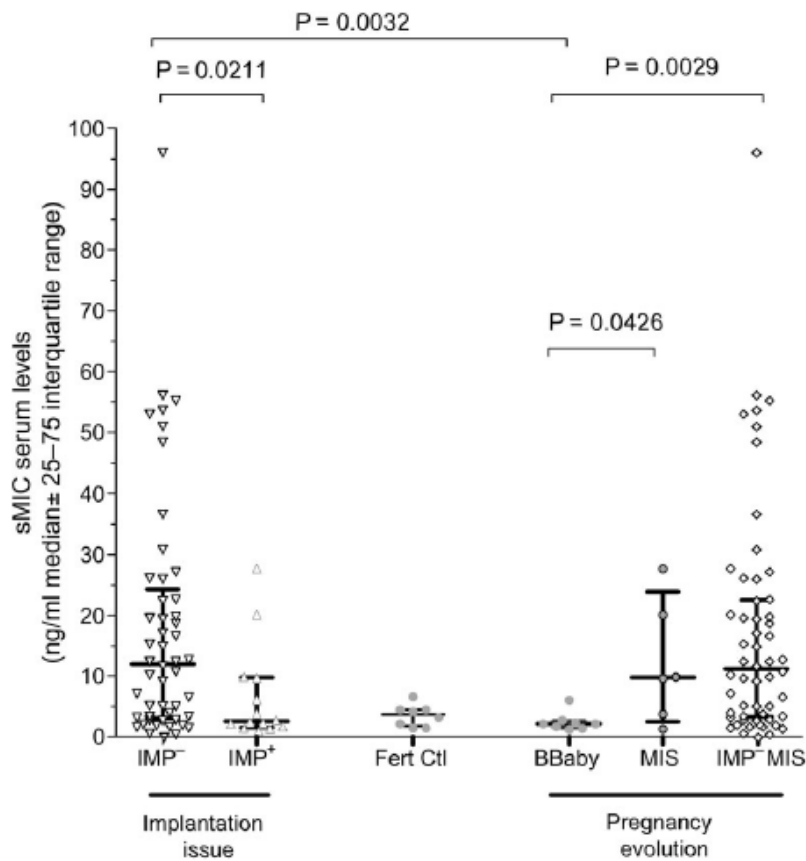


Figura 12: las pacientes con mayores niveles de MIC presentaron menores tasas de implantación y mayores tasas de abortos [26].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

a) Hipótesis de trabajo

En el diseño de este estudio partimos de la siguiente hipótesis. MIC es secretado por el embrión preimplantacional [24] y por tanto debería ser detectado por ELISA en el sobrenadante de cultivo embrionario. El MIC de las primeras etapas embrionarias proviene del RNA mensajero ovocitario ya que en las primeras etapas embrionarias el genoma está silenciado por mecanismos epigenéticos [88]. El MIC ovocitario debería ser detectado en los líquidos foliculares.

Al igual ocurre en algunos tumores, el MIC soluble silenciaría el sistema inmunológico del huesped, en este caso la madre, de modo que su expresión se asociaría a mayores tasas implantacionales y menores tasas de aborto, en contra de lo que describe Porcú-Bouisson [26].

La síntesis embrionaria de MIC debería contribuir a los niveles plasmáticos de modo que estos serían mayores en mujeres con prueba de embarazo positiva.

Si el ovocito es capaz de secretar MIC, la estimulación ovárica con gonadotropinas debería asociarse a mayor liberación de MIC puesto que hay un mayor desarrollo ovocitario y probablemente también por una mayor actividad de la protein kinasa activada mitogénicamente (MAPK) del cúmulo [89]. A su vez, la expresión de MIC plasmática y folicular debería ser proporcional a la respuesta ovárica y al número de ovocitos obtenidos.

Una buena respuesta a la estimulación se asocia de forma habitual a parámetros de buena reserva ovárica como el recuento de folículos antrales o los niveles de FSH [90]. Por tanto, las pacientes con mayor recuento de folículos antrales y menores niveles de FSH deberían expresar MIC con mayor frecuencia. Si MIC juega un papel favorable en la inmunología de la implantación, sería esperable que se asocie también a una mejor calidad embrionaria, y si es proporcional al número de ovocitos se asociaría también a mayor número de embriones obtenidos.

Puesto que la edad de la mujer continúa siendo fundamental e influye en otros marcadores de respuesta ovárica [91], también sería esperable que la expresión de MIC sea mayor en mujeres más jóvenes.

Si MIC se relaciona con la respuesta ovárica y con las tasas de implantación, podría tener un valor predictivo importante en los ciclos de FIV y servir de marcador bioquímico preimplantacional no invasivo a la hora de seleccionar ovocitos y sobre todo embriones.

En el complejo equilibrio que lleva a la inmunotolerancia materno-fetal, es esperable que más moléculas estén implicadas y que a su vez estas se relacionen con MIC. El hecho de que MIC sea una molécula muy polimórfica [92] nos hace pensar que debe haber isoformas implicadas en la estimulación de la ovulación, no detectables por ELISA. Por ello sería necesario el análisis proteómico de los líquidos foliculares para detectar otras proteínas relacionadas con MIC e incluso isoformas de estas.

b) Objetivos:

Para mejorar el rendimiento de las técnicas de reproducción asistida es necesario seleccionar aquel embrión con mayor potencial implantatorio. Sin embargo, los criterios de selección embrionaria, fundamentalmente morfológicos, aunque exhaustivos, resultan insuficientes [93]. En este sentido, el mejor conocimiento de los mecanismos de tolerancia inmunológica implicados en la implantación, con frecuencia infraestimados, podría aportar nuevos parámetros bioquímicos para evaluar las posibilidades de éxito en técnicas de reproducción asistida. El descubrimiento de nuevos métodos de screening bioquímico además de ayudar a una clasificación embrionaria más completa y exhaustiva, presenta la ventaja frente al screening genético, de no ser invasiva [94].

Aunque el embrión posee HLA de origen paterno y sería esperable una reacción de rechazo inmunológico en la madre, esto no sólo no ocurre, sino que la madre desarrolla un ambiente de perfecto equilibrio inmunológico para la implantación embrionaria [95]. Numerosas moléculas implicadas en la respuesta inmunológica se han intentado relacionar con la respuesta a los tratamientos de FIV e incluso con la calidad embrionaria [50, 51, 54, 60]. Sin embargo, ninguna ha demostrado utilidad clínica para seleccionar ovocitos o embriones. Se ha propuesto que la molécula MICA/B ó MIC está involucrada con la invasión trofoblástica [24]. La unión de MIC de membrana desencadena una respuesta inmunológica por la activación de los linfocitos T y la liberación de citoquinas. Sin embargo, cuando MIC es liberado en su forma soluble, parece tener un efecto contrario y bloquea la respuesta inmunológica. Esto ha sido

propuesto como un mecanismo de evasión inmune en algunos tumores [22]. MIC también se ha involucrado en el rechazo a trasplantes [96], eliminación de células infectadas por el virus de la hepatitis C [16] y en enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn [83] y la Colitis Ulcerosa [17, 80]. En la implantación embrionaria parece también que MIC es liberado por el sincitiotrofoblasto ya en el primer trimestre y que bloquea la actividad citolítica de las Natural Killer. En este sentido parece que la producción de MIC sería beneficiosa para la inmunotolerancia maternofoetal [24]. Sin embargo, un estudio posterior asocia mayores niveles de MIC con peores tasas de implantación y mayores tasas de abortos [26]. El objetivo de nuestro estudio es aclarar esta controversia y profundizar en el papel que cumple MICA en la implantación embrionaria. De esta manera esperamos encontrar nuevos marcadores bioquímicos de aplicabilidad clínica en los tratamientos de reproducción asistida. Para ello realizaremos mediciones de MIC por ELISA en el líquido folicular, sobrenadante de cultivo embrionario, suero sanguíneo y sobrenadante de cultivo de las células de la granulosa. Para evaluar la relación de MIC y los tratamientos de reproducción se compararan distintos tratamientos entre sí y para estudiar su relación con la reserva ovárica se estudiarán distintos grupos etiológicos. De esta manera, buscaremos posible asociaciones entre los niveles de MIC y parámetros clínicos, fundamentalmente: reserva y respuesta ovárica, calidad ovocitaria y embrionaria, tasas de implantación y niveles de estradiol.

Por tanto los objetivos de este estudio son:

1. Ver si existe secreción de MICA/B o MIC en el embrión preimplantacional detectable por ELISA.
2. Determinar si existe MIC en el líquido folicular.
3. Estudiar cómo afecta la estimulación ovárica y la gestación en estadios incipientes a los niveles séricos de MIC.
4. Valorar la posible asociación entre la expresión de MIC y la respuesta a la estimulación con gonadotropinas en cuanto al número de ovocitos y número de embriones obtenido.
5. Comparar la expresión de MIC en pacientes con distintas etiologías de infertilidad y distinta reserva ovárica.
6. Comprobar si la expresión de MIC se asocia con las tasas de implantación
7. Relacionar la expresión de MIC con la calidad embrionaria valorada según criterios morfológicos
8. Buscar mediante estudio proteómico de los líquidos foliculares otras posibles isoformas de MIC no detectadas por ELISA y otras proteínas relacionadas con su expresión.
9. Buscar otras proteínas relacionadas con MIC en la inmunología folicular.
10. Analizar si la expresión de MIC tanto en el sobrenadante de cultivo embrionario, en el líquido folicular o en el suero tienen un valor predictivo en los resultados de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Problemas de investigación:

Si realmente MIC juega un papel inmunomodulador en la implantación embrionaria sería esperable que mayores niveles de MIC se asociaran con mejores resultados implantatorios.

I. El hecho de que estudios posteriores indiquen lo contrario sugiere:

- a) Otros factores. Los niveles de MIC podrían depender de algún otro factor que no se haya tenido en cuenta.
- b) Momento implantacional. Los niveles de MIC influyen en la implantación embrionaria de distinta manera según el momento del ciclo o si es pre o postimplantación. En este sentido, los niveles de MIC previos al inicio de estimulación ovárica podrían variar tras el tratamiento con gonadotropinas.
- c) Rango de concentraciones. Existe un rango en las concentraciones de MIC aún no establecido que favorecen la implantación embrionaria y que por encima o por debajo de estas el efecto sea negativo. En cualquier caso, la mejor forma de establecer la posible asociación entre la expresión de una molécula y la capacidad implantatoria de un embrión sería lo que se expone a continuación.

II. Análisis de Células Embrionarias.

- a) PCR. Determinar mediante PCR si la presencia de ARN mensajero (ARNm) de MIC en células embrionarias se relaciona con mejores tasas de implantación. Esto supondría la destrucción de las células embrionarias por lo que este procedimiento es inviable. No sólo no es factible por motivos éticos, sino que si se destruyen las células embrionarias tampoco se puede estudiar la capacidad implantatoria posterior del embrión. Únicamente cabría la posibilidad de hacer PCR de sólo una o dos células, como cuando se realiza Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), pero esto aparte de evidentes problemas técnicos, plantea el problema ético de realizar una biopsia embrionaria, que es una técnica altamente invasiva, con fines puramente científicos.
- b) Citometría de flujo. Medición del MIC de superficie por citometría de flujo. Esta posibilidad plantea varios problemas. Hacer citometría de flujo de un número de células tan escaso como el que puede tener un embrión preimplantacional presenta claros problemas técnicos. Aunque las células no se destruyen, la pérdida de células embrionarias supone los mismos problemas éticos que en el caso de la PCR. Sólo permite estudiar el MIC de membrana, y los estudios parecen apuntar que el MIC soluble tiene una función distinta del MIC de membrana.

III. Medición de MIC soluble en el sobrenadante de cultivo embrionario.

a) Mediante ELISA. Esto se ha intentado hacer con el HLA-G soluble con resultados muy dispares. Entre las causas de esta controversia se encuentran las siguientes.

1. Las cantidades que se espera detectar son ínfimas y están en el límite de detección de la mayor parte de los ELISA.
2. La heterogeneidad de los medios de cultivo utilizados podrían influir en la disparidad de los resultados obtenidos.
3. Los distintos volúmenes de medio de cultivo empleado y la propia técnica de cultivo pueden hacer variar los resultados.
4. Muestras mayores aumentan la dilución de la molécula y con ello disminuyen las probabilidades de detección.
5. Muestras menores a 100 μ l, aunque estén más concentradas no alcanzan el volumen mínimo necesario para la mayor parte de los ELISAs.
6. La película de aceite con que se suele cubrir las microgotas para evitar la evaporación del medio de cultivo podría alterar la detección de la molécula.

En cualquier caso, el análisis de la mezcla de varios sobrenadantes de escaso volumen (mayor concentración) podría ser bastante orientativo, de modo que si se detecta MIC sabremos que el embrión lo expresa en fase preimplantacional, y aunque la cantidad no se pueda asociar con la capacidad de implantación de un determinado embrión, sí se puede buscar asociación con el resultado global.

b) Estudio del sobrenadante de cultivo embrionario mediante proteómica. Presenta el problema que la mayor parte de los medios de cultivo poseen importantes cantidades de albúmina. Puesto que el peso molecular de MIC y el de la albúmina son similares, presentan reactividad cruzada. Además, la gran cantidad de proteínas del medio de cultivo da una importante señal de fondo que hace difícil discriminar las proteínas del sobrenadante. Los métodos proteómicos más modernos y sensibles como el SELDI-TOF presentan el inconveniente de separar pesos moleculares, pero no identifican las proteínas

c) Estudio del sobrenadante de cultivo embrionario mediante la tecnología Luminex. Ha dado buenos resultados con HLA-G pero en el caso de MIC no parece viable debido al gran polimorfismo de la molécula.

IV. Estudio de líquidos Foliculares.

Puesto que existe un periodo de entre 48 y 72 horas durante el cual el genoma embrionario está silenciado [88], cabe la posibilidad que MIC tuviese un origen ovocitario y se pudiese medir en el líquido folicular [97], pero esto también plantea dificultades. Para asociar la secreción de MIC con la capacidad implantatoria del embrión al que dará lugar el ovocito sería necesario aislar el líquido de cada folículo lo que complicaría, enlentecería la labor clínica y aumentaría el riesgo para la paciente al aumentar el tiempo de sedación. Aún en el caso de poder hacerse, la secreción de MIC de un único ovocito sería muy baja y difícil de detectar. El MIC detectado en el líquido folicular no se puede asegurar que provenga del ovocito, ya que existen también las células de la granulosa. Algunos autores incluso admiten la presencia de células inmunes en el folículo ovárico [77]. En cualquier caso, siempre puede provenir de

contaminación sanguínea aunque no sea macroscópicamente apreciable. Sin embargo, la medición de MIC en el líquido folicular puede aportar bastante información. Si es positivo pueden existir las siguientes posibilidades.

- a) Que esté en cantidades inferiores al MIC en suero. Esto podría deberse a contaminación sanguínea.
- b) Que esté en cantidades iguales o superiores, con muestras sin aparente contaminación macroscópica, sugeriría síntesis por parte del ovocito, células inmunes foliculares o de las células de la granulosa. Si este fuese el caso, se podría proceder al cultivo de células de la granulosa. Si MIC no se detecta en el sobrenadante de dicho cultivo, cabría considerar la síntesis ovocitaria o de las células inmunes foliculares si es que admitimos su existencia.

La presencia de MIC en suero ya ha sido descrita, probablemente por secreción endotelial y linfocitaria. Sin embargo, la relación entre la expresión de MIC y los resultados de FIV resultan contradictorios con los conocimientos previos. En el estudio de Porcu-Buisson [26], las determinaciones de MIC se realizan antes de la estimulación ovocitaria por lo que sería interesante ver cómo son los niveles de MIC después de la misma y si guardan relación con algún otro parámetro clínico a parte de las tasas de implantación o de abortos. Según los estudios de Mincheva-Nilson [24] el sincitiotrofoblasto es capaz de sintetizar MIC ya en el primer trimestre del embarazo, pero no especifica en qué momento. La medición de MIC a los 15 días de la transferencia embrionaria junto con la prueba de embarazo, podría ayudar a establecer a partir de qué momento comienza MIC a tener un papel relevante en la inmunología de la gestación. Si la expresión de MIC en pacientes con prueba de embarazo positiva fuese significativamente mayor que en aquellas con prueba de embarazo negativa, se podría sugerir una síntesis muy precoz e incluso periimplantacional.

3.2. Justificación de la investigación y metodología:

a) Parece por tanto razonable para conocer mejor el papel de MIC en la inmunología de la implantación y su medición por ELISA en el sobrenadante de cultivo embrionario. Si MIC es detectable por ELISA en el sobrenadante de cultivo embrionario de embriones de 72 horas, se puede buscar asociación entre su presencia, la calidad embrionaria y las tasas de implantación. La búsqueda de marcadores bioquímicos de calidad embrionaria ayudaría a una mejor selección de los mismos y podría disminuir la necesidad de análisis invasivos como el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP).

Para una primera aproximación habría que mezclar varios sobrenadantes para intentar alcanzar los límites de detección de la técnica.

b) En segundo lugar sería interesante medir MIC en el líquido folicular. No se ha descrito la presencia de MIC en el líquido folicular. Su presencia, excluyendo contaminación sanguínea, sugeriría síntesis ovocitaria, por las células de la granulosa o por células inmunes foliculares. En cualquier caso podría aportar información sobre calidad ovocitaria y respuesta ovárica. Si el análisis del líquido en conjunto se relaciona con calidad ovocitaria, el hallazgo de nuevos parámetros que ayuden a la selección ovocitaria permitiría disminuir el problema ético de los embriones sobrantes.

c) El estudio de sobrenadante de cultivo de células de la granulosa ayudaría a dilucidar el origen del MIC encontrado en el líquido folicular.

d) Suero: Este estudio ya ha sido realizado previo a la estimulación ovárica [26], pero sería de gran interés conocer la expresión de MIC tras la estimulación ovárica, y en concreto, a los 15 días de la transferencia embrionaria. Esto permitirá ver si la

expresión de MIC se ve alterada por la estimulación ovárica con gonadotropinas y si en estadios precoces del embarazo se altera la cantidad de MIC plasmático.

- e) Análisis proteómico de los líquidos foliculares. Si existe distinta expresión de MIC en el líquido folicular en función de la calidad ovocitaria y la respuesta ovárica esto se traducirá en distinta expresión proteómica de los líquidos foliculares. El análisis proteómico puede sugerir la presencia de nuevas proteínas relacionadas con MIC que influyan en la respuesta a los tratamientos estimuladores de la ovulación. No se puede olvidar que dado el gran polimorfismo de MIC, el análisis exclusivo por ELISA podría no detectar isoformas de MIC con relevancia clínica.

3.3. Protocolo de Investigación.

Llevamos a cabo un estudio prospectivo realizado en 364 mujeres sometidas a Técnicas de Reproducción Asistida. Se incluyeron 92 pacientes del Hospital Universitario Madrid Montepríncipe y 272 de GINEFIV. Cada pareja dio consentimiento informado por escrito del procedimiento a realizar como parte del tratamiento de rutina (**apéndices pgs 133**). El protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario La Paz (**apéndices pg 136**). El estudio se financió gracias a una beca para proyectos de aplicación clínica concedido por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario la Paz (**apéndices pg 138**).

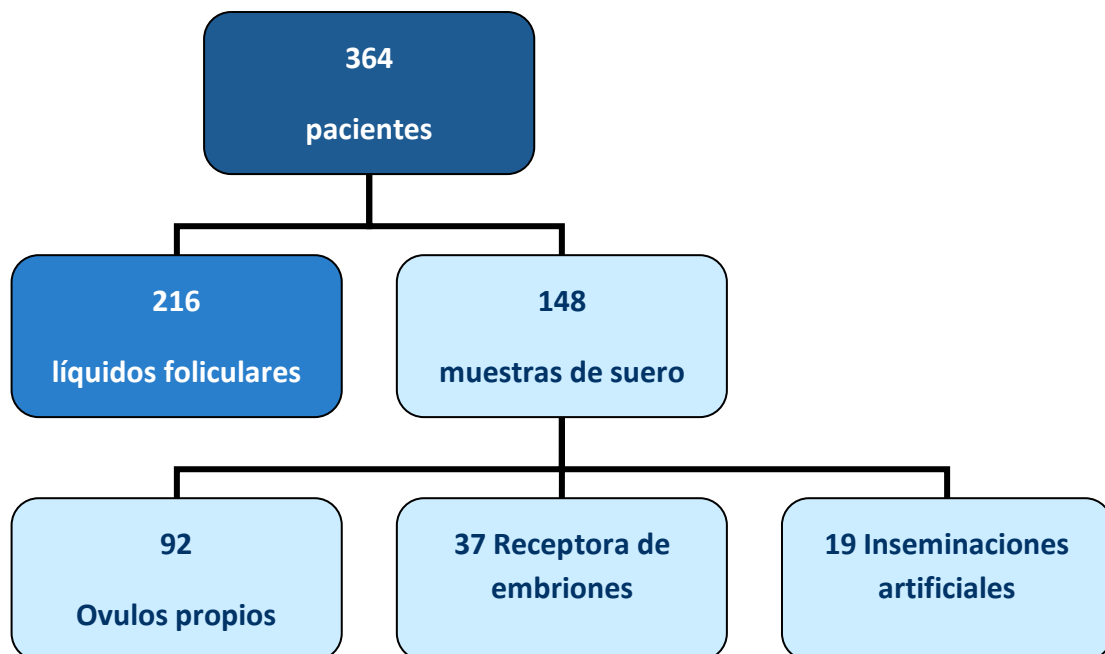


Figura 13: distribución de pacientes en subgrupos

a. Estratificación en subgrupos:

Para valorar como influyen los distintos tratamientos en la síntesis de MIC se compararon: ciclos de FIV con óvulos propios, ciclos de recepción ovocitaria, transferencia de desvitrificados e inseminación artificial (**figura 13**). A su vez, dentro del primer grupo se incluyeron pacientes con distinta reserva ovárica a fin de estudiar su relación con la expresión de MIC

b. Protocolo clínico.

De los ciclos de FIV/ICSI se realizó ICSI en el 81% de los casos, FIV en 5% y técnica mixta en el 14%. Las indicaciones clínicas para el estudio fueron: endometriosis, ovario poliquístico, fallo ovárico, infertilidad de origen desconocido, factor tubárico, factor masculino y donantes de ovocitos. Fueron excluidas las pacientes con hiperprolactinemia y otros trastornos ovulatorios, edad mayor de 50 años, enfermedades estrógeno-dependientes e infección por el HIV. La estimulación ovárica para el desarrollo folicular múltiple se realizó con inyecciones diarias de FSH recombinante (Puregon® Organon o Gonal® Merck-Serono) desde el segundo día de ciclo. En un 30% de los casos, fundamentalmente por encima de los 36 años, se utilizó efecto LH complementario, un 91% en forma de HMG urinaria (Menopur® Ferring) y un 9% LH recombinante (Luperis® Merck-Serono). Las dosis totales de FSH administrada oscilaron en un rango entre 725 y 5.325UI (Media 4.147UI). En el 66% de los casos se utilizó un protocolo largo con agonistas desde el día 21 del ciclo previo con 0,2mL/día acetato de leuprorelina (Procrin® Abbot). En el 44% de los casos se utilizó un protocolo corto con antagonistas. Para evitar la luteinización prematura de los folículos en este último, se administró 0,25mg/día de ganirelix (Orgalutran® Organon)

o cetrotirelix (Cetrotide ® Merck-Serono) en pauta variable, es decir cuando al menos un folículo alcanzaba los 13-14mm. En la pauta de antagonistas se administraron anticonceptivos en el ciclo previo. La maduración final de los ovocitos se realizó cuando se objetivaron al menos 3 folículos con un diámetro medio de 17mm, previa medición de los niveles de estradiol sérico. Ésta se realizó mediante la administración de gonadotropina coriónica humana hCG 10000 UI (Ovitrelle 250µg ® Merck-Serono), salvo en aquellas pacientes con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, en cuyo caso administramos triptorelina 0,2mg, (Decapeptyl ® Ipsen Pharma). Consideramos que existe tal riesgo cuando los niveles de estradiol son superiores a 3500pg/ml, existe más de 150pg/ml de estradiol por folículo maduro (>16mm) o cuando hay más de 15 folículos maduros. Los ovocitos fueron recuperados mediante punción transvaginal ecoguiada 36 horas después de la administración de hCG o triptorelina. El líquido folicular de cada paciente se aspiró de forma conjunta. La centrifugación y la congelación de los líquidos se realizaron el mismo día de la punción para evitar la acción de proteasas sobre las proteínas foliculares. Cada ovocito fertilizado se incubó en una microgota de 30 microlitros de medio de cultivo bajo una fina capa de aceite mineral para evitar la evaporación durante 72 horas. Durante este tiempo se mantuvieron los embriones a 37°C y 6% de CO₂, observando su evolución con un microscopio de 600 aumentos cada 24 horas. Al cabo de este tiempo se seleccionaron los embriones supervivientes en función de: velocidad de división, bloqueo embrionario, tamaño y simetría celular, aspecto del citoplasma, grosor de la zona pelúcida, número de blastómeras multinucleadas, tipo y porcentaje de fragmentación de blastómeras. Se transfirieron entre 1 y 3 embriones para lo que, previa limpieza del cervix con suero fisiológico y aspiración del moco cervical, se cargó la jeringa con 0,02ml de medio de transferencia y se transfirieron los embriones con una cánula

flexible (Labotec ®). El apoyo a la fase lútea se realizó con progesterona natural micronizada (Progeffik ® Effik) por vía vaginal en dosis de 200mg/8horas desde la punción folicular. Las pacientes guardaron reposo relativo las 48 horas siguientes a la transferencia. A los 15 días de la transferencia se realizó una prueba de embarazo en sangre y se consideró implantación positiva cuando la β -HCG en sangre se situó por encima de 25mUI/ml. Consideramos tasa de gestación bioquímica el número de β -HCG positivas dividido entre el número total transferencias realizadas. Tasa de gestación clínica sería el número de sacos gestacionales evidenciados ecográficamente por transferencia.

c. Clasificación de pacientes:

Las pacientes fueron clasificadas en función de la reserva ovárica valorada por los niveles de FSH en el tercer día del ciclo y el recuento de folículos antrales en la primera visita. Consideramos alta reserva ovárica FSH <10 mUI/ml y/o >10 folículos antrales de media por ovario. En baja reserva se englobaron pacientes con FSH >10mUI/ml y/o <5 folículos antrales por ovario. Las pacientes con entre 5 y 10 folículos antrales y FSH < 10 mUI/ml se consideraron normoovuladoras. Según estos criterios y otros parámetros clínicos, se seleccionaron cinco grupos de pacientes: síndromes de ovario poliquísticos, donantes, pacientes normoovuladoras, endometriosis y baja reserva ovárica. Las pacientes con ovarios poliquísticos presentan alta reserva ovárica por definición (más de 10 folículos antrales por ovario). En el grupo de donantes el 25% presentaron alta reserva ovárica. Las donantes con menos de 5 folículos antrales se excluyeron. Entre las pacientes normoovuladoras incluimos fundamentalmente aquellas con esterilidad de origen desconocido, factor masculino y factor tubárico. Entre las pacientes con baja

reserva tendríamos dos grupos. Pacientes con factor etario (edad >39 años) y otro grupo de mujeres menores de 39 años que presentan una disminución de la reserva ovárica sin causa aparente pero con reglas normales y que hemos llamado fallo ovárico oculto.

En los ciclos de recepción embrionaria se administraron 2 a 4 mg/día de valerianato de estradiol. En este grupo incluimos tanto las receptoras de ovocitos como los ciclos con embriones congelados. La transferencia de los mismos se realizó cuando el endometrio alcanzó un mínimo de 8mm.

d. Recogida de Muestras.

- Líquidos foliculares. Los líquidos macroscópicamente hemáticos se excluyeron. Tras aislar los ovocitos se centrifugaron los líquidos foliculares no hemáticos durante 10 minutos a 3000rpm acumulándose dos muestras de cada líquido que se congelaron a -20°C en criotubos de 2 ml (**figura 14**).
- Sobrenadantes de Cultivo Embrionario. Tras la transferencia embrionaria se recogieron los sobrenadantes de cultivo embrionario. En la mitad de los casos se aisló el sobrenadante de cada embrión (25 muestras). En la otra mitad se mezclaron en el mismo tubo de PCR (200µl) los sobrenadantes de todos los embriones transferidos juntos (25 muestras). También se recogieron unos 20 sobrenadantes de los embriones no transferidos que se dejaron evolucionar a blastocistos.
- Sobrenadante de cultivo de células de la granulosa. En casos en los que se realizó ICSI, entre 2 y 4 horas después de la punción se separó el ovocito de las células del cúmulo con una solución de hialuronidas de 80UI/ml y pipetas

pasteur. Las células de la granulosa aspiradas se cultivaron durante 7 días a 37°C.

▪ Suero. A los 15 días de la transferencia embrionaria se realizó una prueba de embarazo en sangre. Para ello se separó el suero de cada muestra en un tubo de bioquímica de 5ml. Tras la determinación de los niveles de β HCG el suero sobrante se congeló a -20°C y las muestras se almacenaron debidamente etiquetadas para su análisis posterior.

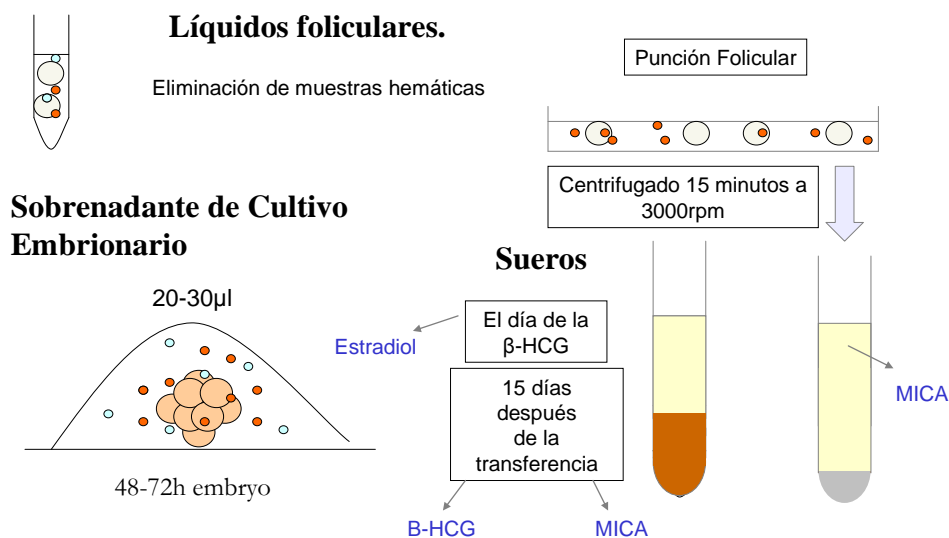


Figura 14: se analizó MIC en los líquidos foliculares, sobrenadante de cultivo embrionario y suero a los 15 días de la transferencia

c. Análisis de las muestras: detección de MIC.

Se determinó la concentración de MIC en los líquidos foliculares, sobrenadantes de cultivo embrionario, sobrenadante de cultivo de células de la granulosa y suero utilizando el ELISA comercial para la detección de MICA de R&D. Todas las muestras se hicieron por duplicado. El límite de detección del mismo fue de 62,5pg/ml. El kit

utilizado fue el DuoSet DY1300. El anticuerpo de captura utilizado fue el anti-MICA de ratón 841614 y el anticuerpo de detección el anti-MICA de cabra biotinilado 841614, ambos de R&D. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente inmediatamente antes de la realización del ELISA. Para preparar la recta patrón se realizaron diluciones seriadas de la solución estándar de MICA recombinante, inicialmente a 220ng/ml a 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31pg/ml (8µl de solución estandar en 400µl de reactivo diluyente). Para preparar las placas en primer lugar se diluyó en PBS el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo, en este caso de 360µg/ml a 2µg/ml. Se cubrieron los 96 pocillos de cada microplaca con 100µl de dicha dilución. Las placas selladas se incubaron a temperatura ambiente durante 12horas. Tras aspirar el contenido de cada pocillo se lavaron las placas con 200µl de buffer de lavado (0,05% Tween 20 en PBS) por placa. Este se dejó 5 minutos por placa. El lavado se repitió 3 veces y después de cada uno se secó la placa debidamente. Cada pocillo se llenó con 200µl de reactivo de dilución (BSA al 1% en PBS) para bloquear las placas y evitar así unión inespecífica de proteínas al pocillo. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas como ha sido previamente descrito. Se añadieron 100µl por pocillo de cada dilución de la solución estandar y de cada muestra (por duplicado) y se incubó (siempre sellando las placas con un film transparente para evitar la evaporación) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las placas y se añaden 100µl de anticuerpo de detección por pocillo. Tras otras dos horas de incubación se lavaron de nuevo las placas y se añadieron 100µl de Streptavidina-HRP (conjugada con peroxidasa de rábano). Fueron incubadas durante 20 minutos evitando el contacto directo con la luz. Tras lavar las placas se añadieron otros 100µl de la solución de sustrato (mezcla 1:1 de H₂O₂ y tetramethylbenzidina) y se incubaron otros 20 minutos en oscuridad. Sin lavado previo, se añadieron 50µl de la solución de

frenado (2NH₂SO₄) y se leyó la densidad óptica de cada pocillo a 450 y a 550nm en el lector de microplacas. A las densidades ópticas a 450nm se les restó las densidades a 550nm que se consideraron debidas a las imperfecciones de la placa (**figura 15**).

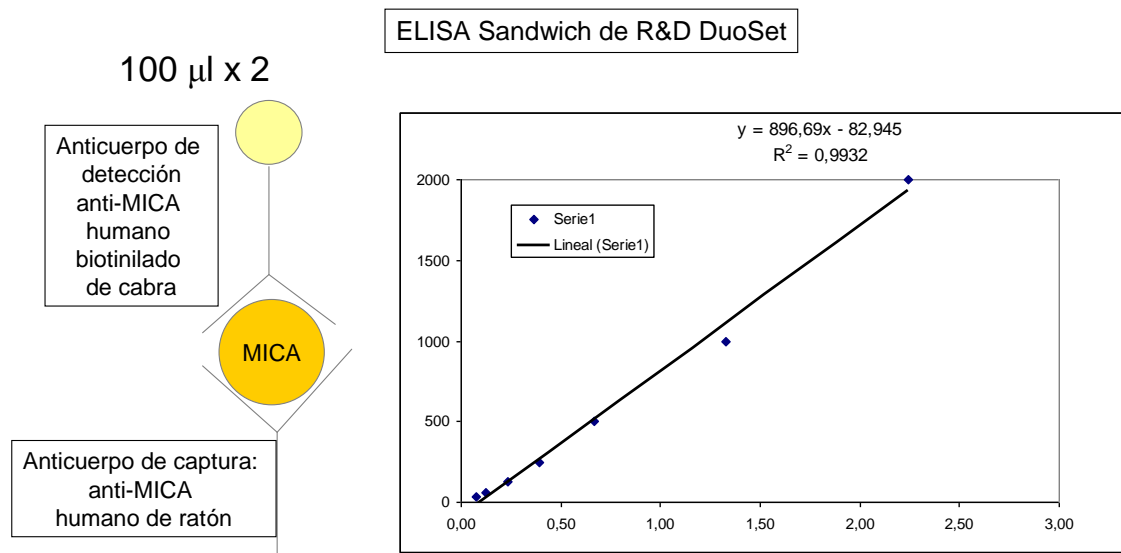


Figura 15: anticuerpos para la detección de MICA por ELISA. La recta patrón permite extrapolar concentraciones a partir de intensidad de señal

d. Estudio Proteómico de los Líquidos Foliculares

Para la cuantificación proteica de los líquidos foliculares se utilizó la técnica SELDI-TOF-MS (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) que significa Espectrometría de Masas en tiempo de vuelo por desabsorción-ionización de láser de superficie. Esta es una técnica proteómica para analizar muestras complejas de proteínas. Representa la combinación exitosa de la cromatografía y la espectrometría de masas, estando integrada dentro del sistema Ciphergen's ProteinChip, que permite el análisis proteico sobre una única plataforma experimental.

Al igual que en la MALDI-TOF-MS las proteínas para ser analizadas son cocrystalizadas con compuestos de absorción UV y vaporizadas por una fuente de láser pulsado UV. Las proteínas ionizadas son entonces aceleradas en un campo eléctrico y la masa de estas se puede deducir en función de su velocidad.

En este caso, se centrifugaron las muestras de líquido folicular y los sobrenadante se congelaron en criotubos de 2ml, se etiquetaron con el n° de historia y el subgrupo, enviándose a la Universidad de Jena en Alemania. Allí, cada muestra se aplicó a una mancha (spot) de una placa de análisis proteico (ProteinChip Arrays) químicamente preparada con cromatografía planar. De este modo las proteínas se unen activamente con la superficie cromatográfica y quedan secuestradas según su potencial de interacción de superficie.

Posteriormente se lava la placa con una solución tampón o buffer. De este modo se logra separar las proteínas de sales y otros contaminantes. La placa cromatográfica proporciona un buen soporte para la cocrystalización de la matriz y señala las proteínas. Con esto se consigue la formación de una capa homogénea en el spot, dejando una superficie cristalina ideal para el análisis posterior

El lector proteico del SELDI es especialmente sensible y reproducible. La fuente iónica y el detector están contruidos para soportar una transmisión y detección iónica muy eficiente sobre un amplio rango de masas. El posicionamiento preciso de la fuente de láser es controlado por un programa informático tanto de forma manual como automática. El proceso es visualizado en un mapa pixelazo que tiene la ventaja de permitir múltiples análisis simultáneos. Las herramientas del programa permiten la normalización del espectro resultante de toda la corriente iónica para su calibración cuantitativa interna. Esto permite gran precisión y reproductibilidad incluso para

analizar muchas muestras biológicas complejas. Otra de las ventajas del SELDI sobre el MALDI es que en el SELDI se pueden utilizar las muestras directamente, sin procesamiento previo. Esto permite un mejor aprovechamiento de las mismas ya que en el procesamiento previo se suele perder importantes cantidades de muestra. En el SELDI las proteínas se unen directamente a la placa pues está químicamente activada.

Es importante señalar que el SELDI-TOF-MS sólo detecta masas de proteínas sino que indica si existe una expresión diferente, aunque no las identifica. En primer lugar la placa selectora elegida fracciona las proteínas en función de su carga. Esto simplifica el análisis porque en ocasiones unas proteínas inhiben la ionización de otras. Así las proteínas más abundantes inhiben la ionización de las menos abundantes y de glico y fosfoproteínas (**figura 16**).

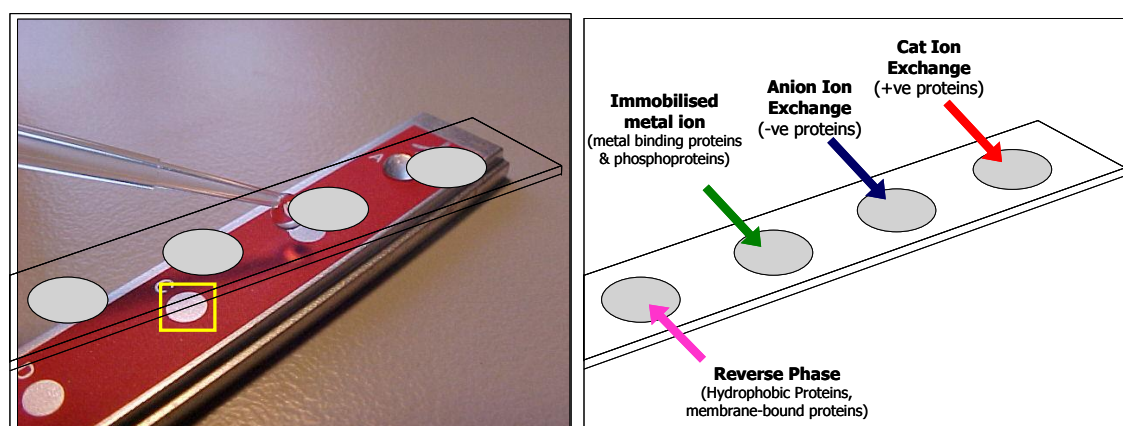


Figura 16: el SELDI-TOF requiere separación de las proteínas en función de su carga previo al análisis proteómico.

Posteriormente se añade una matriz absorbente (ácido α -ciano-4-hidroxycinámico para las proteínas de <de 20KDalton y ácido sinapínico para las de más de 20KD). Un pulso rápido de láser de unos 4ns que hace que se añada o sustraiga un protón a los péptidos

permitiendo así la ionización de los mismos. De este modo las proteínas están cargadas y se mueven al ser sometidas a un campo eléctrico (**figura 17**).

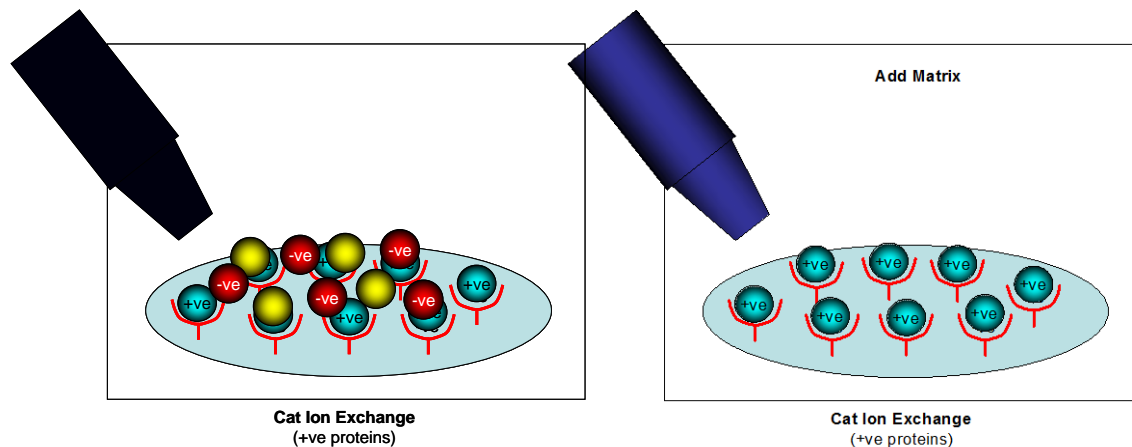


Figura 17: la ionización de las proteínas permite su movimiento en un campo eléctrico.

Se extraen de la fuente y se colocan entre placas metálicas con cargas opuestas y viajan en el espectrómetro de masas. Todas las proteínas están expuestas al mismo campo eléctrico y por tanto tienen energía cinética constante. De este modo la aceleración de las proteínas ya sólo depende de la masa. Las proteínas más ligeras viajan más deprisa y alcanzan antes el detector situado al final del tubo de vuelo. Midiendo el tiempo que tarda la proteína en atravesar el analizador es posible determinar con exactitud su masa pues el tiempo de vuelo de un ión es proporcional al cuadrado de su masa (**figura 18**).

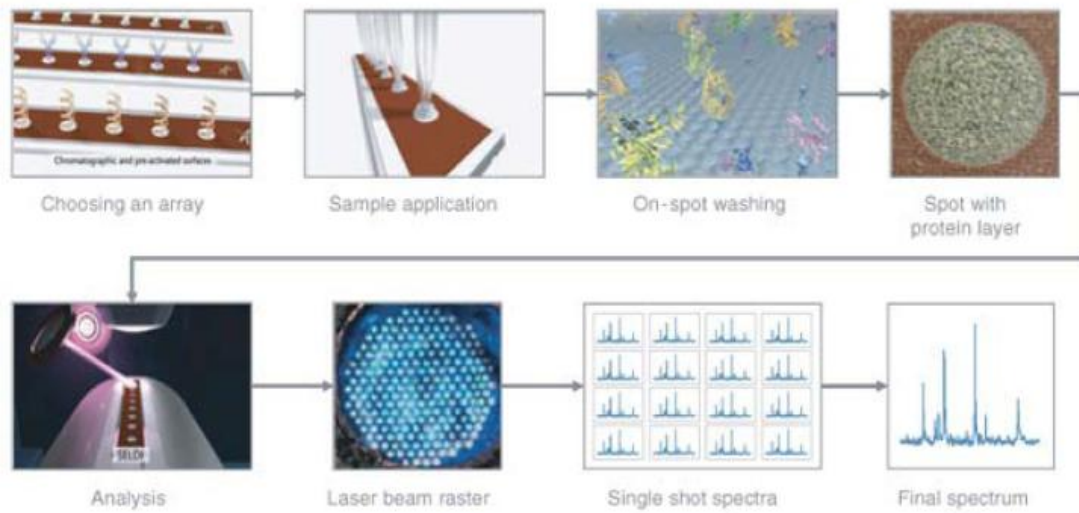


Figura 18: la velocidad a la que las proteínas viajan en el espectrómetro de masas nos da una estimación de su masa. En el espectro, cada pico corresponde a una proteína.

3.4. Análisis Estadístico

a. Expresión de MIC detectada por ELISA

Se buscó asociación entre los parámetros clínicos y MIC con el programa SPSS. Se consideró como valor estadísticamente significativo una $p < 0,05$. Para encontrar asociación entre la expresión de MIC y la implantación y entre la expresión de MIC y la etiología (alta reserva ovárica y normoovuladoras versus endometriosis y bajas respondedoras) se utilizó el test Exacto de Fisher. Se utilizó la U de Mann Whitney para encontrar relación entre la expresión de MIC y el número de folículos antrales, los niveles de FSH, los niveles de estradiol, los ovocitos recuperados, la edad, el número de embriones transferidos, y la dosis de gonadotropinas empleadas. La asociación entre la calidad embrionaria y la expresión de MIC se estudió mediante la Chi cuadrado de Pearson. Para evaluar el valor de MIC para predecir la implantación embrionaria se determinaron: sensibilidad, especificidad, tasa de falsos positivos, tasa de falsos negativos, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

b) Análisis proteómico:

El programa informático Ciphergen Express Client 3.0, incorporado al SELDI-TOF, analiza finalmente las diferencias en los perfiles proteicos de los distintos tipos de pacientes y donantes. Cuando se comparan dos grupos: donantes frente a bajas respondedoras, donantes frente a pacientes con endometriosis y donantes frente a SOP, si la proteína sigue una distribución normal se usa Chi cuadrado y si la proteína no sigue una distribución normal se usa la U de Mann-Whitney. Cuando comparamos cada

proteína entre todos los subgrupos se utilizó ANOVA para distribuciones normales y Kruskal Wallis para el resto (**tabla1**).

number of groups	Distribution	
	normally distributed	not normally distributed
2 groups	<p><u>2-sided t-Test</u></p> $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(s^2/n_1) + (s^2/n_2)}}$ $s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$ <p>t test statistic s standard deviation n number of measurements</p>	<p><u>Mann-Whitney U Test</u></p> $U = n \cdot m + \frac{n \cdot (n+1)}{2} - R$ <p>U test statistic n, m number of measurements R rank</p>
2 paired groups	<p><u>paired t-Test</u></p> $t = \frac{\bar{d}}{s_d}$ <p>t test statistic mean of differences \bar{d} s_d standard error of differences</p>	<p><u>Wilcoxon t-Test</u></p> $t = \frac{\bar{R}}{SE_R}$ <p>t test statistic \bar{R} mean rank SE_R standard error</p>

Tabla 1: en comparaciones dos a dos de distribución no normal usamos la U de Mann-Whitney, en comparaciones de 4 subgrupos usamos el test de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

a) Estudio descriptivo:

1. Tamaño muestral

Se han analizado 414 muestras: 148 muestras de suero, 216 líquidos foliculares y 50 sobrenadantes de cultivo embrionario. De las muestras de suero, 92 procedían de ciclos de fecundación in Vitro (FIV) en fresco, 16 en ciclos de recepción ovocitaria, 21 en transferencias de desvitrificados y 19 de inseminación artificial. En estos, se determinó MIC el mismo día de la prueba de embarazo, 15 días postransferencia. De los líquidos foliculares analizados, en 122 se realizó además estudio proteómico del líquido folicular. El estudio del sobrenadante de cultivo embrionario y de células de la granulosa se realizó en mujeres en las que también se estudió el líquido folicular por lo que el número total de pacientes es 364 (**tabla 2**).

	Líquido folicular	Suero	Total
Síndrome de ovario poliquístico	55	15	70
Donantes	59	0	59
Normoovuladoras	23	33	56
Endometriosis	30	12	42
Bajas respondedoras	49	32	81
Recipientes de embriones	0	37	37
Inseminación artificial	0	19	19
total	216	148	364
MIC +	73	26	99

Tabla 2: distribución de los subgrupos de pacientes y tipos de muestras analizadas: 216 líquidos foliculares, 148 muestras de suero y 50 sobrenadantes de cultivo embrionario, total 414.

2. Edad.

La edad media fue 34,07 años (SD 5,618). La edad media de las mujeres receptoras de ovocitos fue de 39,76 años, en transferencia de desvitrificados de 36,93, mientras que en ciclos de FIV en fresco con óvulos propios de 33,83 (**figura 19**).

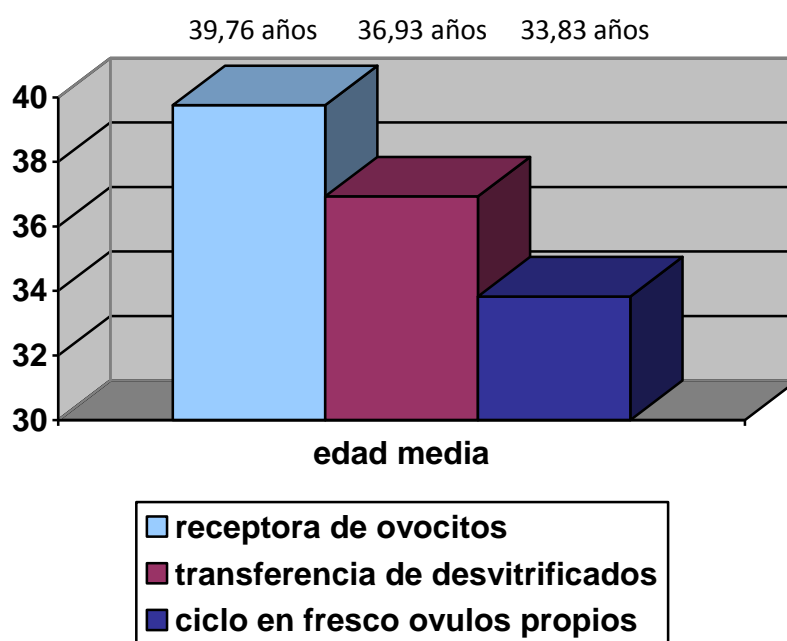


Figura 19: edad media en receptoras de ovocitos, transferencia de desvitrificados y ciclos en fresco con óvulos propios

3. Etiología: dentro de los ciclos en fresco con óvulos propios, 70 (23%) pacientes presentaban síndrome de ovarios poliquísticos, 59 (19%) eran donantes, 56 (18%) normoovuladoras, 42 (14%) endometriosis y 81 (26%) bajas respondedoras (**figura 20**).

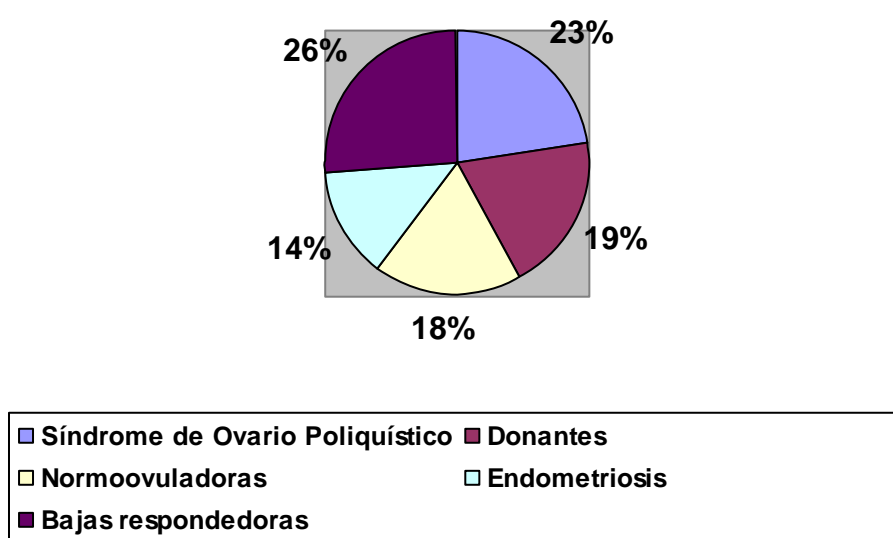


Figura 20: distribución de las pacientes en subgrupos

4. Calidad Embrionaria:

Según la clasificación la Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR), la distribución de las calidades embrionarias transferidas fue la siguiente: 28,35% de los embriones fueron de la primera categoría, 32,98% de la segunda, 35,56% de la tercera y sólo el 3% de la cuarta.

5. Determinaciones de MIC.

En total se estudió la expresión de MIC en 364 pacientes (414 muestras), en 147 sueros, 216 líquidos foliculares y 50 sobrenadantes de cultivo embrionario. Se detectó MIC en el 73 (33,79%) líquidos foliculares analizados y en 32 (21,62%) muestras de suero (**tabla 2**). La media de las concentraciones de MIC en dichas muestras fueron respectivamente 627pg/ml y 722pg/ml. No se detectó MIC en ninguno de los sobrenadantes de cultivo embrionario analizado. Se acumularon incluso varios sobrenadantes hasta conseguir muestras de 100 microlitros y aun así el resultado fue negativo. Cuando se analizaron sobrenadantes de cultivo de embriones llevados a estadio de blastocisto tampoco se detectó MIC en ninguna de las muestras analizadas. Sí se detectaron trazas de MIC en uno de los sobrenadantes de las células de la granulosa cultivadas.

Centrándonos en el análisis de muestras de suero, las receptoras de ovocitos expresaron MIC en el 68,75%, las transferencias de desvitrificados en el 55% y los ciclos en fresco con óvulos propios en el 18,47% (**figura 21**).

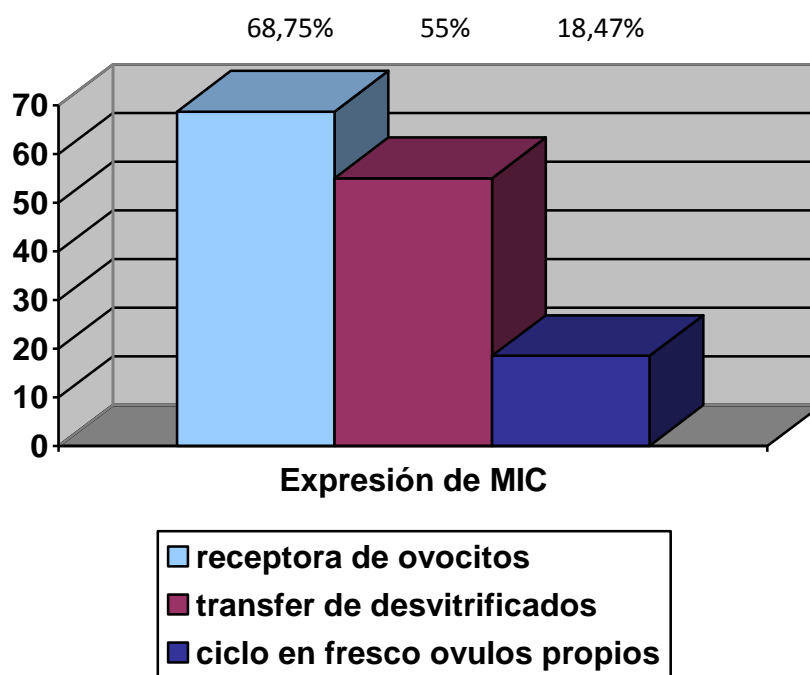


Figura 21: expresión de MIC en los distintos grupos de pacientes

b)Estudio analítico:

1. Relación entre expresión de MIC y tipo de tratamiento

Las receptoras de embriones expresaron MIC con más frecuencia, 68,75%, frente a 55% en embriones desvitrificados y 18,47% en ovocitos propios en fresco. Sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Chi 2 de Pearson $p=0,31$).

2. Relación entre la edad y tipo de tratamiento.

La media de edad de las receptoras de ovocitos fue 39,77 años, mayor que la edad en receptoras de embriones desvitrificados (36,94 años) y que en ciclos en frescos con óvulos propios (33,8 años). Las medianas fueron respectivamente 40, 37 y 34 años. Al aplicar el test de Kruskal-Wallis ($p=0,001$) observamos que hay diferencias significativas en la edad entre los tres grupos (tabla 3). Para dilucidar estas diferencias se hicieron comparaciones dos a dos corrigiendo el índice de significación, nueva $p = 0,05 / 3 = 0,016$.

EDAD(años)	Receptoras de ovocitos	Transferencia de embriones	
		Desvitrificados	Óvulos propios transferencia en fresco
Media	39.77*	36.94*	33.84*
Lim inf IC 95%	36.99	34.43	33.20
Lim sup IC95%	42.55	39.44	34.49
Mediana	40.00	37.00	34.49
Desviación est.	4.604	4.697	5.697
Mínimo	33	30	18
Máximo	48	46	46
Rango	15	16	28
Percentil 5	33.00	30.00	21.15
Percentil 10	33.00	30.00	26.00
Percentil 25	36.50	33.25	31.00
Percentil 50	40.00	37.00	34.50
Percentil 75	43.00	39.75	38.00
Percentil 90	47.20	45.30	40.00
Percentil 95			41.96

*Test Kruskal Wallis: p=0.001

Tabla 3: Comparación entre la edad de los 3 grupos de pacientes. Al comparar las medias las diferencias resultaron estadísticamente significativas.

No existen diferencias significativas en cuanto a la edad de las receptoras de ovocitos y las receptoras de embriones vitrificados (39,77 versus 36,94; U de Mann-Whitney; $p=0,110$). Sí, en cambio, se encuentran entre las receptoras de ovocitos y los ciclos en fresco con óvulos propios. Las pacientes receptoras son significativamente mayores (media=39,77 años) que las que hicieron ciclos en fresco con óvulos propios (media=33,84 años; U de Mann-Whitney; $p=0,000$). Sin embargo, también se observa que las pacientes que reciben embriones vitrificados tienden a ser mayores que las que hacen ciclos en fresco (36,94 versus 33,84), aunque estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p=0,067$) (**tabla 4**).

U de Mann-Whitney			
Recept-desvitrific	39.77	36.94	$p=0.110$
Recept-ov prop	39.77	33.84	$p=0.000$
Desvitrific- ov prop	36.94	33.84	$p=0.067$

Tabla 4: comparación 2 a 2 de la edad media entre los grupos de pacientes

3. Relación entre tipo de tratamiento y tasas de embarazo

Aunque no hay diferencias significativas entre las tasas de gestación en los tres grupos, se observa la siguiente tendencia: las receptoras de ovocitos tienen una tasa de embarazo superior a las que realizan ciclos con óvulos propios, tanto con transferencia en fresco como con transferencia de desvitrificados (73,3% frente a 52,45 y 44,4%). A su vez, la tasa de gestación en ciclos de desvitrificados es ligeramente superior a la de los ciclos en fresco (52,4% frente a 44,4%). Estas diferencias no son significativas (Chi cuadrado de Pearson; $p=0,078$) (**tabla 5**).

	Receptoras de ovocitos	Transferencia de embriones Desvitrificados	Óvulos propios transferencia en fresco
Tasa de Gestación	73.3%	44.1%	52.45%

Chi cuadrado de Pearson $p=0.078$

Tabla 5: tasa de gestación en los tres grupos de pacientes

4. MIC y Reserva Ovárica:

a. MIC sérica y reserva ovárica.

En una primera aproximación ya se observó que las pacientes que expresaban MIC sérica tuvieron un mayor número de ovocitos recuperados. La media de ovocitos con MIC positivo fue de 14,65 frente a 9,44 con MIC negativo (**tabla 6**). Al aplicar la U de Mann-Whitney observamos que las diferencias son efectivamente significativas ($p=0,003$)(**figura 22**).

Nº ovocitos recuperados	MIC en suero -	MIC en suero +
Media	9.44	14.65
Lim inf IC 95%	8.23	11.16
Lim sup IC 95%	10.66	18.13
Mediana	8.00	13.00
DE	5.154	6.782
Mínimo	0	4
Máximo	22	29
Rango	22	25

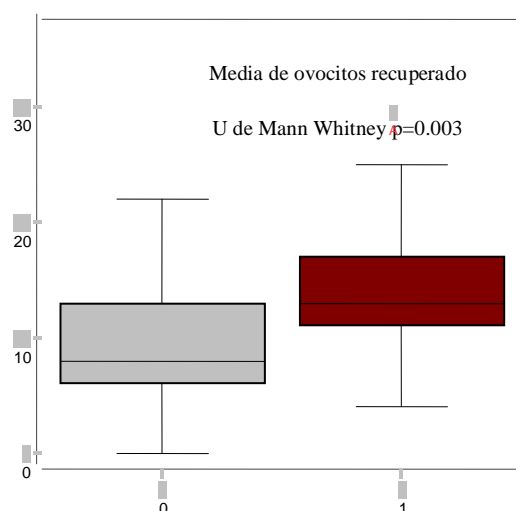


Tabla 6 (arriba): comparación entre ovocitos recuperados y expresión de MIC

Figura 22 (izquierda): Box plot en el que se observa que el número medio de ovocitos recuperados es significativamente mayor cuando se detecta MIC sérica

Las pacientes con MIC en suero también presentaron mayor recuento de folículos antrales (7,25 versus 6,01) y menores niveles de FSH el tercer día de regla (5,69 versus 6,99mUI/ml). Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas. Observamos, que estas variables son cuantitativas y presentan una importante dispersión. Por ello se han realizado curvas ROC (**figura 23**) intentando buscar un punto de corte para los folículos antrales de suficiente sensibilidad y especificidad pero que al transformar la variable en cualitativa disminuya la dispersión.

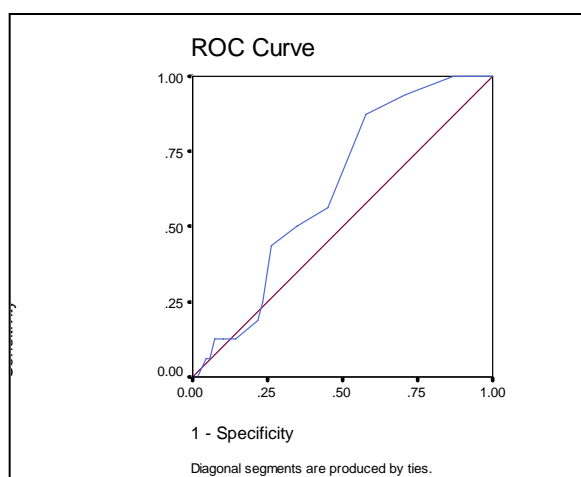


Figura 23: curva ROC para determinar un punto de corte del número de folículos antrales lo suficiente sensible y específico para predecir MIC sérica.

Positive if Less Than or Equal To	Sensitivity	1 - Specificity	Specificity	S+S
0	1,00	1,00	0,00	1,0000
1,5	1,00	0,94	0,06	1,0580
2,5	1,00	0,87	0,13	1,1304
3,5	0,94	0,71	0,29	1,2274
4,5	0,88	0,58	0,42	1,2953
5,5	0,56	0,45	0,55	1,1132
6,5	0,50	0,35	0,65	1,1522
7,5	0,44	0,26	0,74	1,1766
8,5	0,25	0,23	0,77	1,0181
9,5	0,19	0,22	0,78	0,9701
10,5	0,13	0,14	0,86	0,9801
11,5	0,13	0,10	0,90	1,0236
12,5	0,13	0,07	0,93	1,0525
13,5	0,06	0,06	0,94	1,0045
14,5	0,06	0,04	0,96	1,0190
15,5	0,00	0,01	0,99	0,9855
17	0,00	0,00	1,00	1,0000

Al realizar la curva ROC para encontrar un punto de corte del número de folículos antrales suficientemente sensible y específico de la presencia de MIC en suero, observamos que mayores valores de la variable resultado indican mayor evidencia para un resultado real positivo que es 1. Es decir, el máximo valor de la sensibilidad y de la especificidad es 1, y por tanto buscamos un punto de corte en el que la suma de la sensibilidad y la especificidad sea máxima. En el recuento de folículos antrales este punto de corte es 4,5 (**figura 23**).

Estableciendo como punto de corte 4,5 folículos antrales observamos que por encima de éste la expresión de MIC es más frecuente (25,45%) que cuando la media de antrales es menor o igual a 4,5 (6,67%). Para valorar si estas diferencias son significativas utilizamos el test exacto de Fisher, obteniéndose una $p=0,043$, es decir, estadísticamente significativo (**figura 24**).

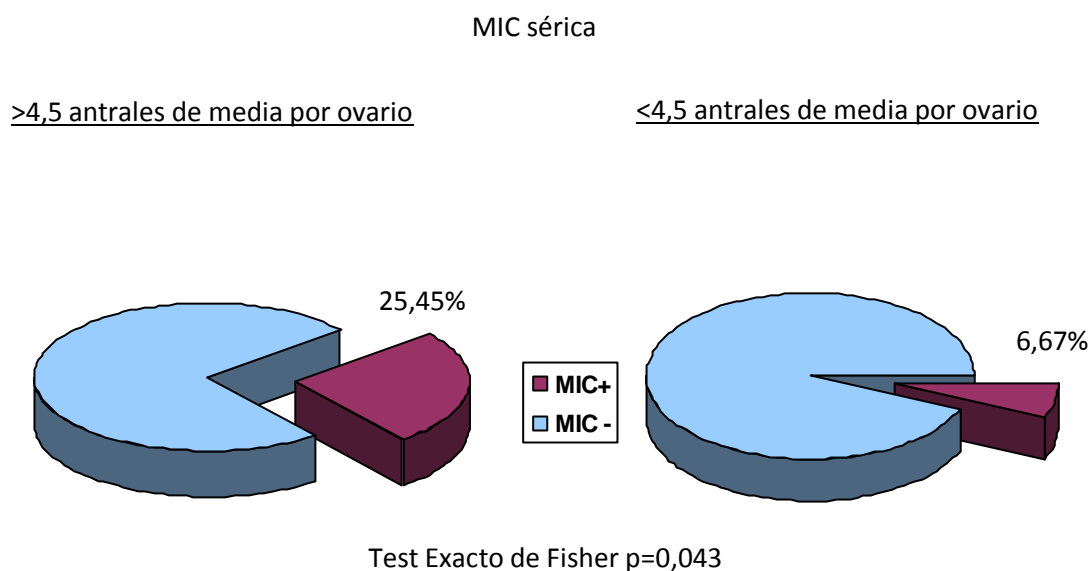


Figura 24: la expresión de MIC sérico se asocia a mayor recuento de folículos antrales

Cuando comparamos los niveles de FSH como variable cuantitativa con la presencia de MIC sérica observamos que las pacientes que tienen MIC presentan niveles medios de FSH mayores (6,927mU/ml) que las que no expresan MIC (5,693mUI/ml). Aunque estas diferencias no resultaron significativas, parece encontrarse una importante tendencia ($p=0,068$). Puesto que la dispersión fue muy importante (desviaciones estándar de 2,82 y 1,85 respectivamente) decidimos aplicar curvas ROC para establecer un punto de corte y transformamos esta variable en cualitativa. Observamos que cuando se establece el punto de corte de la FSH en 6,05mU/ml, la expresión de MIC sérica en pacientes con FSH menor que 6,05UI/ml fue 27,5% frente a 9,52% con FSH superior a 6,05mU/ml. Al aplicar la Chi cuadrado para comprobar si estas diferencias son significativas obtuvimos una $p=0,047$, es decir estadísticamente significativa (**figura 25**).

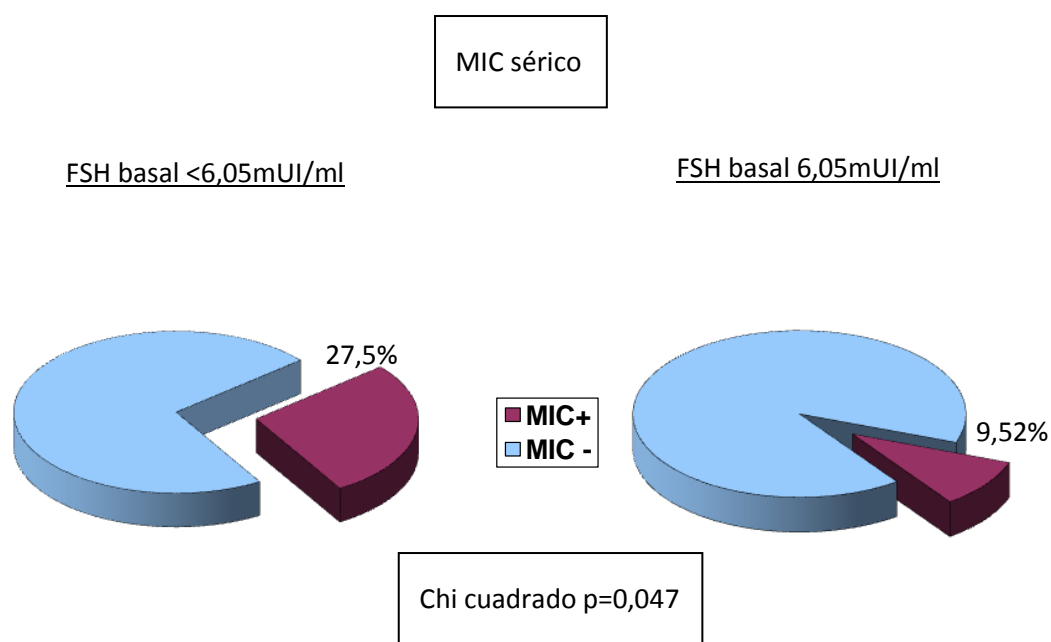
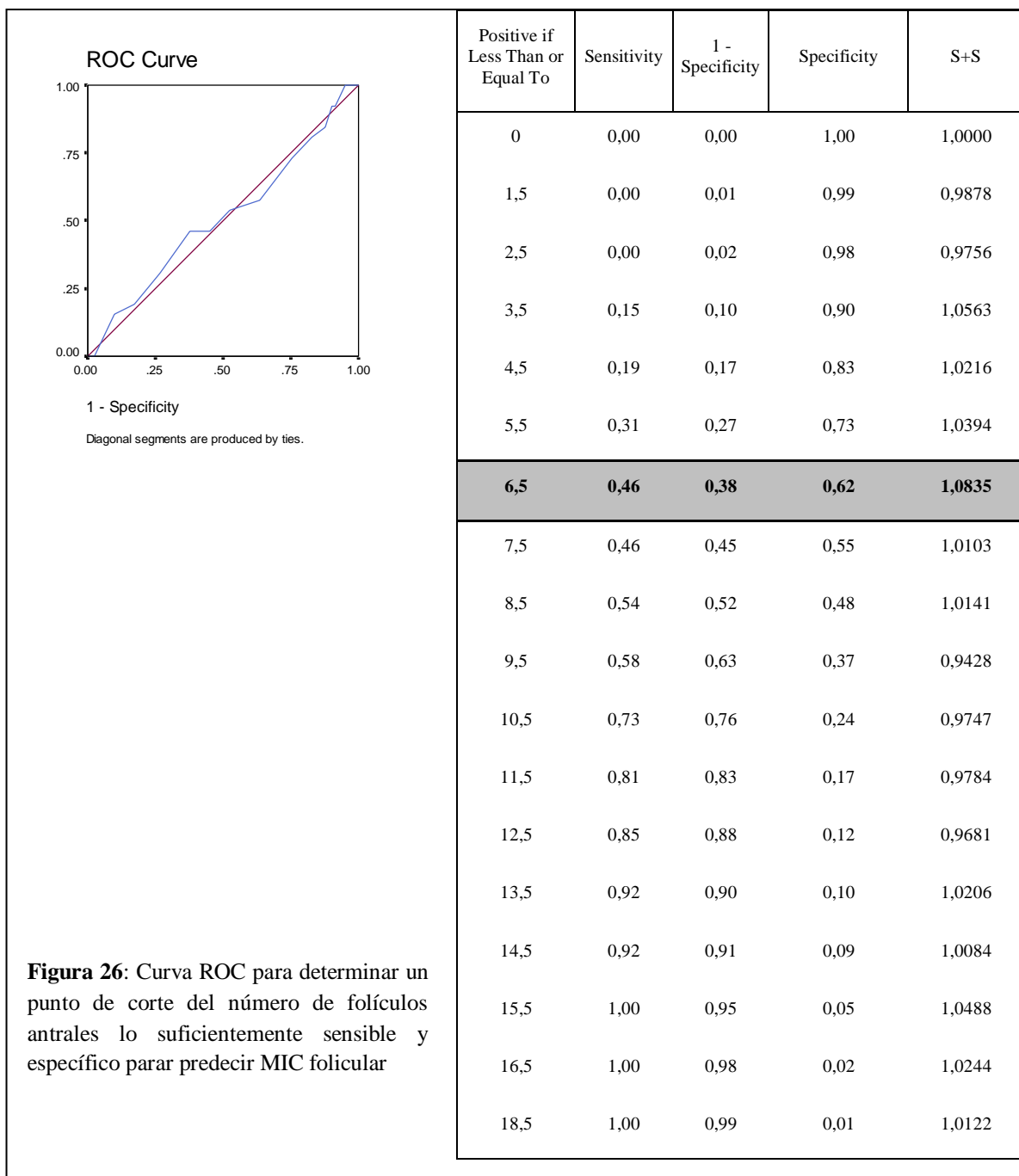


Figura 25: la expresión de MIC sérica se asocia a menores niveles FSH

b. MICA Folicular y reserva ovárica.

Al aplicar las curvas ROC para determinar un punto de corte del número de folículos antrales (**figura 26**) lo suficientemente sensible y específico de la expresión de MIC en el líquido folicular observamos que este es 6,5 folículos antrales por ovario.



Observamos que con 6,5 ó menos folículos antrales se detecta MIC en el 27,91% de los líquidos foliculares y con 6,5 ó más antrales en el 21,54%. Estas diferencias no resultaron significativas ya que al aplicar el test de la Chi cuadrado obtenemos una $p=0,495$.

La media de la FSH en el grupo con MIC folicular positivo fue de 7,912mUI/ml frente a 7,797mUI/ml con MIC negativo ($p=0,148$). Las desviaciones estándar fueron respectivamente 5,7mUI/ml y 2,9 mUI/ml. Estableciendo un punto de corte en 8,61mUI/ml y transformando por tanto la variable en cualitativa observamos que las pacientes con MIC folicular presentan con más frecuencia (50,88% versus 29,81%) niveles superiores a 8,61mUI/mL. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa $p=0,011$ (**figura 27**). Por tanto, al contrario de lo que sucedía con el MIC sérico, el MIC folicular se asocia a mayores niveles de FSH.

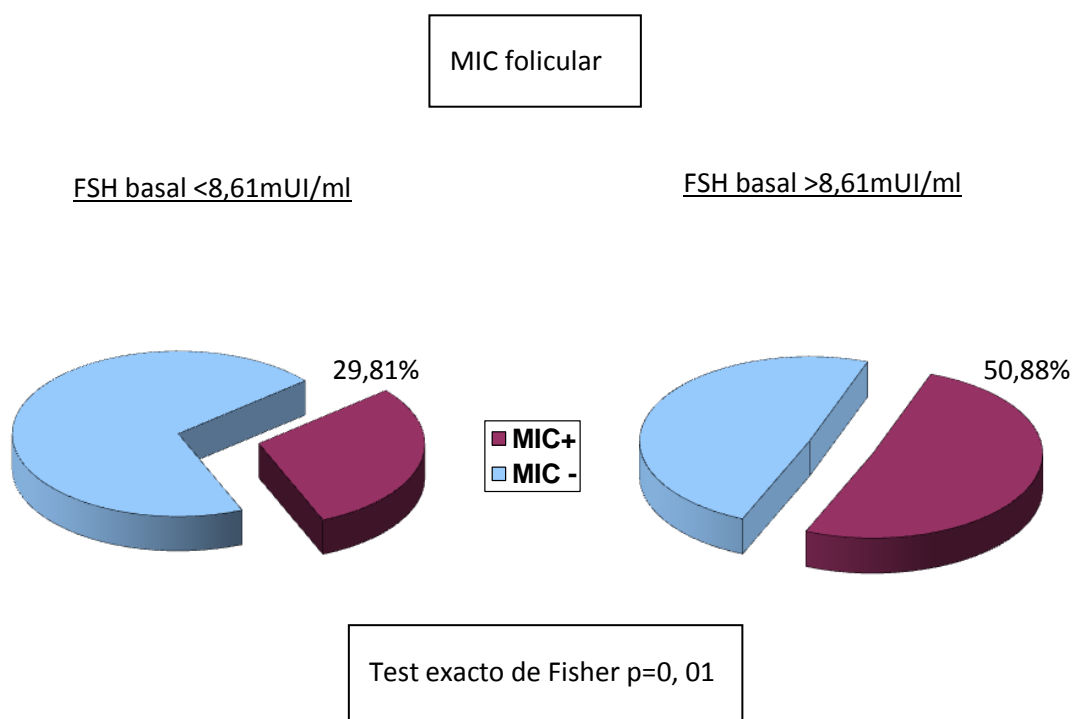


Figura 27: la presencia de MIC folicular se asocia a mayores niveles de FSH

En contra de lo que ocurre con el MIC sérico, las pacientes con MIC folicular tuvieron menor número de ovocitos recuperados (10,41 versus 12,08) aunque la diferencia no fue significativa ($p=0,394$)(**tabla 7**).

MICA LF	MIC +	MIC-	Mann Whitney U (p)
Media de folículos antrales por ovario	6,76	8,06	0,469
Ovocitos recuperados	10,41	12,08	0,394

Tabla 7: no se encontró asociación entre el número antrales y ovocitos recuperados y MIC folicular

5. MIC y niveles de estradiol

a. MIC sérica y estradiol

La media de estradiol en pacientes con MIC sérica fue 1.688,71pg/ml frente a 1.864pg/ml en pacientes sin MIC. Estas diferencias no fueron significativas, U de Mann-Whitney, $p=0,921$. En pacientes con MIC sérico el máximo de estradiol detectado fue 3.400 pg/ml y no hubo ninguna cancelación por síndrome de hiperestimulación (**tabla 8**).

Estradiol día HCG (pg/ml)	MIC en suero -	MIC en suero +
Media	1864.1	1688.71
Lim inf IC 95%	1192.82	1181.96
Lim sup IC 95%	2536.19	2195.47
Mediana	1595.00	1405.5
DE	2338.455	877.674
Mínimo	314	398
Máximo	17122	3400
Rango	16808	3002

Tabla 8: no se encontró asociación entre los niveles de estradiol y MIC sérico

b. MIC folicular y estradiol

Observamos que en las pacientes en la que se expresa MIC folicular los niveles de estradiol son significativamente menores: 1.322,22 versus 1.844,23pg/ml; U de Mann Whitney $p=0,01$ (tabla 9).

Estradiol día HCG (pg/ml)	MIC folicular -	MIC folicular +
Media	1844.23	1322.22
Lim inf IC 95%	1644.99	947.92
Lim sup IC 95%	2043.46	1696.52
Mediana	1771.00	1308.50
DE	722.831	752.685
Mínimo	398	80
Máximo	3876	3084
Rango	3478	3004

Tabla 9: las pacientes con MIC folicular presentan menores niveles de estradiol

6. MIC y edad de la paciente

A su vez, las pacientes con MIC folicular presentaron una edad significativamente superior 34,81 frente a 32,52; U de Mann Whitney $p=0,003$ (**tabla 10**). Sin embargo no se encontró asociación significativa entre la edad de las pacientes y la expresión de MIC sérica, siendo en ambos grupos similar 35,06 años con MIC sérico positivo frente 34,471 con MIC negativo (U de Mann Whitney $p= 0,345$)

Estradiol día HCG (pg/ml)	MIC folicular -	MIC folicular +
Media	32.52	34.81
Lim inf IC 95%	31.54	33.40
Lim sup IC 95%	33.50	36.22
Mediana	33.10	36.00
DE	5.85	6.04
Mínimo	18	19
Máximo	46.00	43.83
Rango	28.00	24.83

Tabla 10: la presencia de MIC folicular se asoció a mayor edad de las pacientes.

U de Mann Whitney $p=0,003$

7. MIC y etiología de infertilidad

a. MIC sérica y etiología de infertilidad

Dentro de los ciclos de FIV en fresco, se encontró que aquellas mujeres con mayor reserva ovárica expresaban MIC con mayor frecuencia (33,3%) que aquellas con baja reserva ovárica (2,3%): test exacto de Fisher $p=0,000$ (**figura 28**).

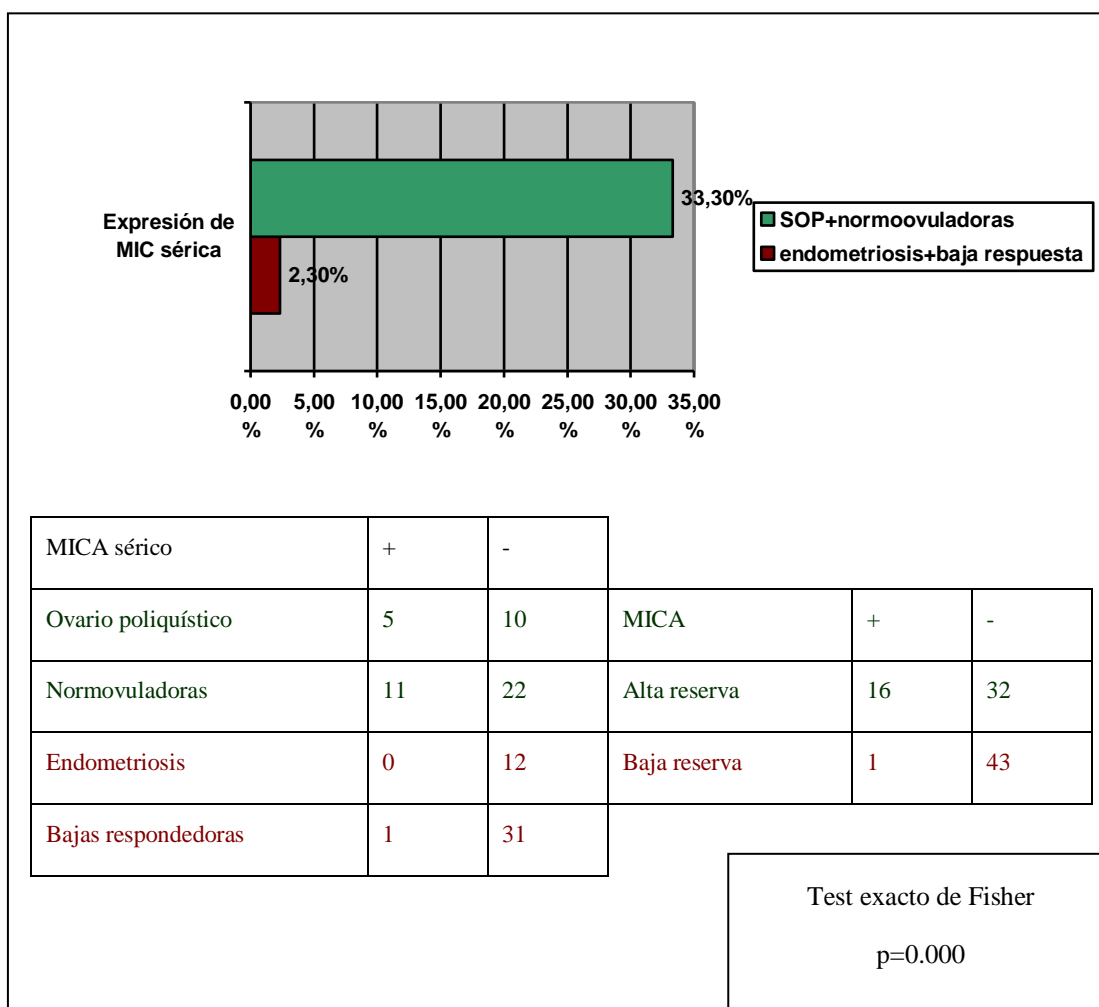


Figura 28: pacientes normoovuladoras y con ovarios poliquísticos expresaron MIC con más frecuencia que las pacientes con endometriosis o baja reserva.

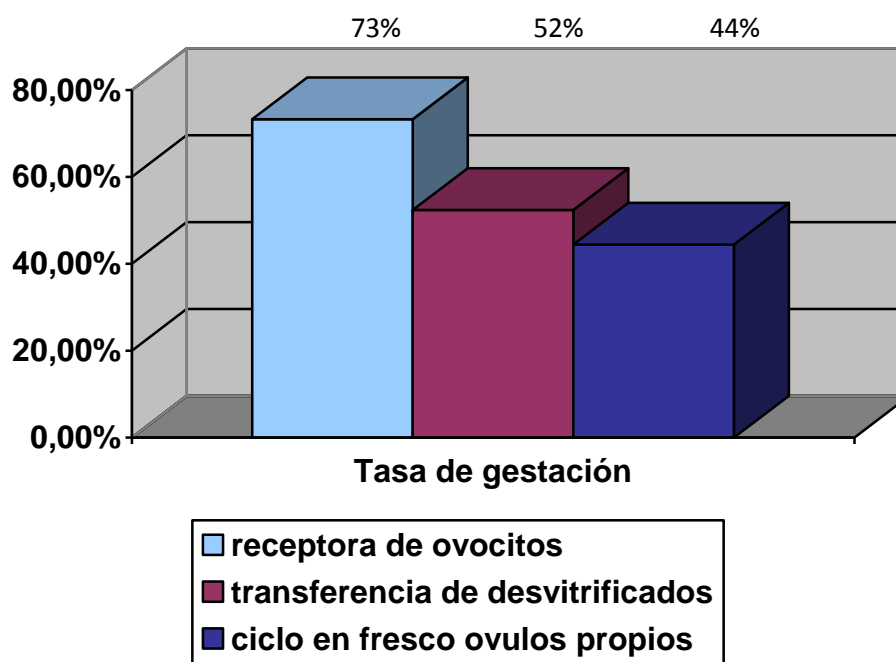
De este modo, la expresión de MIC en suero en pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos (POCs) es igual que en normoovuladoras, 50%. Ambos grupos pueden ser englobados en buena reserva ovárica por tener ambas más de 5 folículos antrales. Sumando ovario poliquísticos y normoovuladoras, es decir, alta y normorrespuesta tenemos 48 pacientes. Sin embargo, ninguna endometriosis y sólo una baja respondedora presentaron MIC en suero. Bajas respondedoras y endometriosis son ambas pacientes con baja reserva ovárica, por lo que se pueden agrupar y tendríamos que en el grupo de baja reserva ovárica (total 44 pacientes).

b) MIC folicular y etiología de infertilidad:

En el líquido folicular no se encontró esta asociación. Las mujeres con endometriosis y las bajas respondedoras (total 79) presentaron MIC en el 25% de las muestras de líquido folicular y las altas respondedoras, donantes y síndromes de ovarios poliquísticos (total 137) en el 26% de las muestras. Al aplicar el test exacto de Fisher, estas diferencias no fueron significativas $p=1,00$.

8. Valor predictivo de Gestación.

En contra de resultados previamente descritos, no se encontró asociación entre la expresión de MIC y las tasas gestación bioquímica. La muestra de pacientes fue homogénea a pesar de incluir distintos subgrupos: ciclos en fresco con óvulos propios, ciclos con óvulos de donación y transferencias de desvitrificados. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las tasas de gestación bioquímica entre los tres grupos (Chi cuadrado de Pearson $p=0,078$) (**figura 29**).



	Value	df	Asymp. Sig. (z-sided)
Pearson Chi-Square	5.107 ^a	2	.078
Likelihood Ratio	5.215	2	.074
Linear-by-Linear Association	4.830	1	.028
N of Valid Cases	315		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.95.

Figura 29: tasas de gestación bioquímica en los 3 grupos.

- a) MIC en suero. Como describimos previamente, se detectó MIC en sólo 32 de las 148 muestras de suero analizadas. La tasa de gestación clínica en estas 148 mujeres fue de 42,65%. La tasa de gestación en mujeres en las que se detectó MIC en suero fue de 45,16% frente a 40,52% en aquellas en cuyos sueros no se encontró MIC (116) (**tabla 11**). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al aplicar la Chi cuadrado ($p=0,838$). La utilización de MIC en suero para predecir gestación presentó una sensibilidad del 22,95%, una especificidad de 79,38%, una tasa de falsos negativos de 77,05%, una tasa de falsos positivos del 20,7%, un valor predictivo positivo (VPP) de 45,16% y un valor predictivo negativo (VPN) de 56,03% (**tabla 12**).

MIC	+	-	Test exacto de Fisher
suero	45,16%	40,50%	P=0,838
Líquido folicular	46,87%	45,31%	P=0,879

Tabla 11: tasas de gestación en función de la expresión de MIC

		IC 95%
Sensibilidad	23.0%	14.2% a 34.9%
Especificidad	79.3%	69.3% a 86.6%
Valor predictivo positivo	45.2%	29.2% a 62.2%
Valor predictivo negativo	58.0%	48.8% a 66.8%
Proporción de falsos positivos	20.7%	13.4% a 30.7%
Proporción de falsos negativos	77.0%	65.1% a 85.8%

Tabla 12: MIC sérico como parámetro predictivo de gestación

b) En el análisis de los líquidos foliculares tampoco se encontró asociación, y la tasa de implantación en las 73 mujeres con líquido folicular positivo para MIC fue de 46,87% frente a 45,31% en aquellas con líquido folicular negativo (143) $p=0,879$ (**tabla 11**). La utilización de MIC en el líquido folicular como marcador de gestación tuvo las siguientes tasas: sensibilidad 34,09%, especificidad 67,3%, tasa de falsos positivos 53,12%, tasa de falsos negativos 65,91%, valor predictivo positivo 46,87% y valor predictivo negativo 54,6% (**Tabla 13**).

		IC 95%
Sensibilidad	34.1%	25.0% a 44.5%
Especificidad	67.3%	57.8% a 75.6%
Valor predictivo positivo	46.9%	35.2% a 58.9%
Valor predictivo negativo	54.7%	46.1% a 63.0%
Proporción de falsos positivos	32.7%	24.4% a 42.2%
Proporción de falsos negativos	65.9%	55.5% a 75.0%

Tabla 13: MIC folicular como parámetro predictivo de gestación

9. MIC y calidad embrionaria.

a) MIC en suero y calidad embrionaria:

No se encontró asociación entre la expresión de MIC sérica y la calidad de los embriones obtenidos según la valoración embrionaria empleada en nuestro protocolo y descrita en el apartado 4. La expresión de MIC en suero se detectó en 27.5% de los embriones de la primera categoría, 36.5% de los de la segunda, 35.7% de la tercera y 16% de la cuarta (**tabla 14a**) (Chi cuadrado de Pearson $p=0,573$).

EMBRIONES	I	II	III	IV
MIC sérica +	27,5%	36,5%	37,7%	16%

Tabla 14a: distribución de las calidades embrionarias y MIC sérico

b) MIC folicular y calidad embrionaria

Respecto a la distribución de las calidades embrionarias observamos que cuando MIC en el líquido folicular es positivo existe un mayor porcentaje de embriones de primera categoría 22,5 (**tabla 14b**). Si bien esta diferencia no alcanza el grado establecido como significativo (Chi cuadrado de Pearson $p=0,06\%$).

EMBRIONES	I	II	III	IV
MIC +	22,5%	16,30%	35,5%	25,70%

Tabla 14b: asociación entre la expresión de MIC folicular y la distribución de calidades embrionarias

10. MIC y embriones por ciclo

a) MIC sérica y embriones por ciclo

Al valorar si existen diferencias entre el número de embriones por ciclo entre las pacientes que presentan MIC en suero y las que no, nos encontramos lo siguiente. La media de embriones por ciclo en el grupo con MIC sérico fue de 3,11 frente a 1,77 en el grupo sin MIC sérico. Sin embargo, las medianas fueron iguales y las diferencias no resultaron significativas al aplicar el test no paramétrico de la U de Mann Whitney: $p=0.170$ (**tabla 15**)

Nº embriones obtenidos	MIC sérico+	MIC sérico negativo
Media	3.11	1.77
Lim inf IC 95%	1.19	1.62
Lim sup IC95%	5.04	1.92
Mediana	2.00	2.00
Desviación estandar.	3.76	0.63
Mínimo	1.00	0.00
Máximo	16.00	3.00
Rango	15.00	3.00
Percentil 5	1.00	0.00
Percentil 10	1.00	1.00
Percentil 25	2.00	2.00
Percentil 50	2.00	2.00
Percentil 75	2.00	2.00
Percentil 90	10.4	2.00
Percentil 95		3.00

Test Statistics^a

	SUMA
Mann-Whitney U	523.500
Wilcoxon W	3298.500
Z	1.971
Asymp. Sig. (2-tailed)	.170

a. Grouping Variable: SERUM MICA

Tabla 15: asociación entre MIC sérica y embriones por ciclo.

b. Embriones por ciclo y MIC folicular.

De las 216 pacientes en las que se estudió MIC en el líquido folicular se obtuvieron 733 embriones, 3,39 embriones de media por ciclo. En las 73 pacientes en las que se detectó MIC en el líquido folicular la media de embriones fue de 3,73, frente a 3,21 embriones por ciclo cuando MIC en el líquido folicular fue negativo. U de Mann-Whitney $p=0.988$

(tabla 16)

Nº embriones	MIC folicular +	MIC sérico -
Media	4.77	1.77
Lim inf IC 95%	3.71	1.62
Lim sup IC95%	5.83	1.92
Mediana	3.00	2.00
Desviación estándar	4.45	0.63
Mínimo	0.00	0.00
Máximo	22.00	15.00
Rango	22.00	15.00
P5	0.00	0.00
P10	1.00	1.00
P25	2.00	2.00
P50	3.00	3.00
P75	6.25	7.00
P90	10.9	9.00
P95	13.8	11.00

U de Mann-Whitney $p=0.988$

Tabla 16. Asociación entre el número de embriones obtenido y la expresión de MIC folicular

11. MIC y proteómica del líquido folicular.

En primer lugar se observa que las pacientes con MIC presentan menor expresión de la proteína de 6680 Dalton, $p=0.029$ (**figura 30**). También se ha visto que la presencia o ausencia de MIC modifica la expresión proteómica en los distintos subgrupos. Así, en pacientes sin MIC folicular, la expresión de la proteína de 8577 Dalton es máxima en donantes y mínima en pacientes con factor etario. Sin embargo cuando se detecta MIC folicular la expresión de 8577 Dalton sigue siendo mínima en pacientes con factor etario pero es máxima en pacientes con ovarios poliquísticos (**figura 31**). En otras proteínas no encontramos relación significativa entre la expresión de MIC y la proteómica de los distintos subgrupos. Para la proteína de 79091 Dalton también encontramos que cuando no hay MIC folicular la expresión es máxima en fallo ovárico precoz y mínima en fallo ovárico oculto. Sin embargo, en pacientes con MIC folicular la expresión es muy homogénea en todos los grupos (**figura 32**).

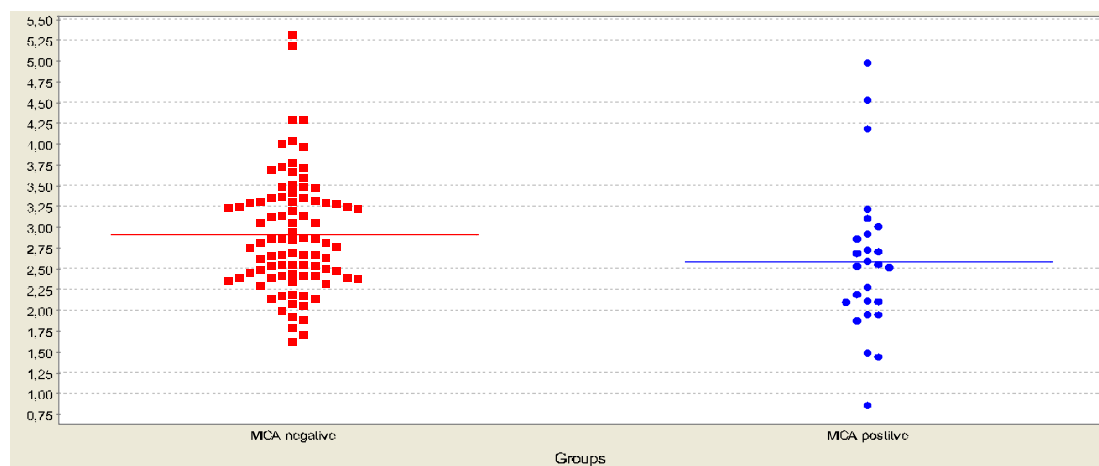


Figura 30: Expresión diferencial de la proteína de 6680Dalton entre pacientes sin MIC folicular (rojo) y pacientes con MIC folicular; $p=0,029$

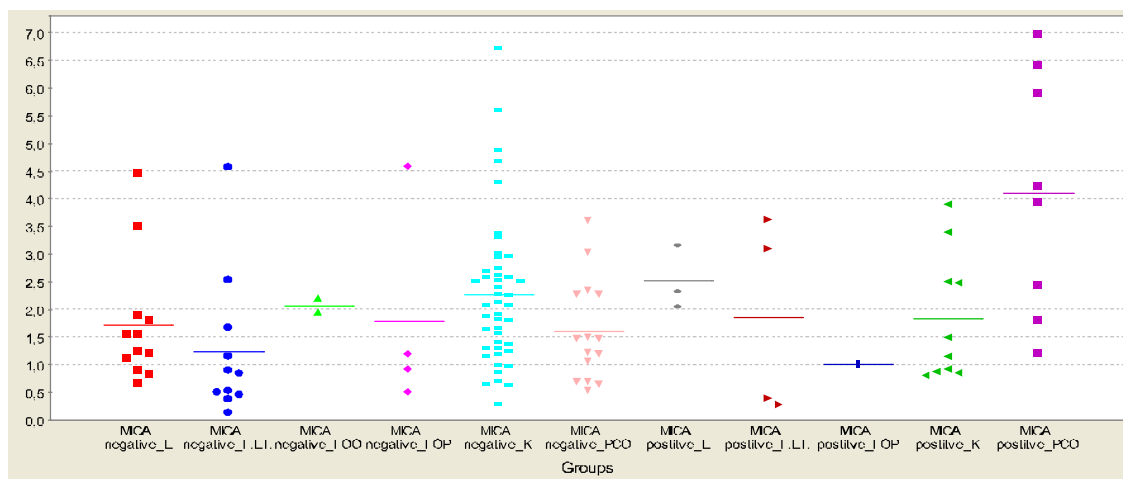


Figura 31: La expresión de la proteína de 8577 Dalton en los distintos subgrupos es diferente según exista o no MIC folicular $p=0,019$. De este modo observamos que cuando no se detecta MIC esta tiene máxima expresión en donantes (K turquesa) y mínima en pacientes con factor etario (I.L.I azul). Cuando se detecta MIC folicular, aunque la mínima expresión sigue siendo en factor etario, esta es máxima en pacientes con ovarios poliquísticos (PCO violeta). L serían las bajas respondedoras que incluyen factor etario (I.LI), fallo ovárico oculto (I.OO) y fallo ovárico precoz (I.OP).

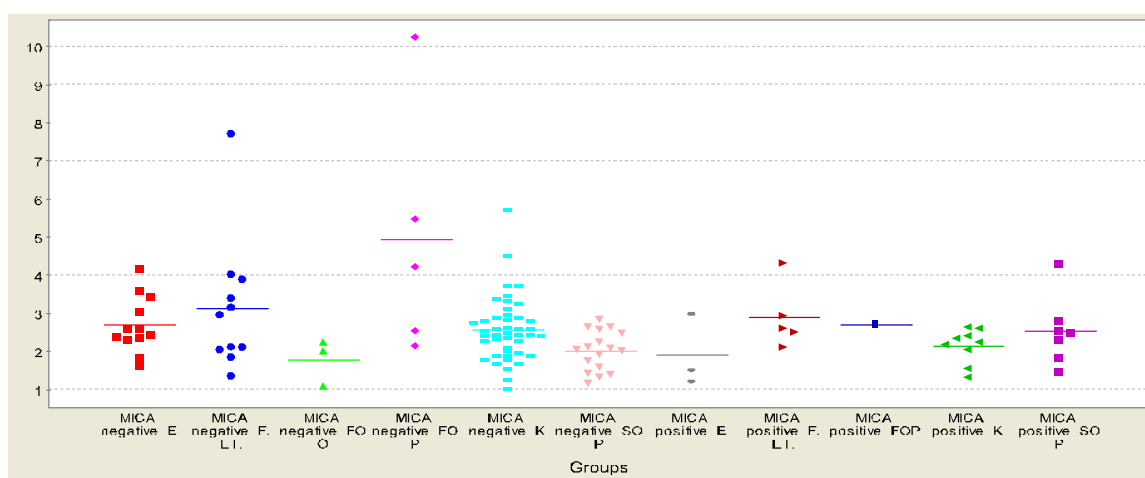


Figura 32: La expresión de la proteína de 79091 Dalton en los distintos subgrupos también es diferente en función de la expresión de MIC, $p=0,031$. En pacientes sin MIC folicular, esta es máxima en pacientes con fallo ovárico precoz (FOP) y mínima en pacientes con fallo ovárico oculto (FOO). Cuando MIC es positivo la expresión de 79091Dalton es muy similar en todos los grupos.

a) MIC y proteómica folicular del SOP.

En pacientes con SOP, la expresión de la proteína de 8577Da es significativamente ($p=0,005$) mayor cuando además de expresa MIC (**figura 33**). Sin embargo, la expresión de la proteína de 37145Da es mayor en pacientes sin MIC, $p=0,033$ (**figura 34**)

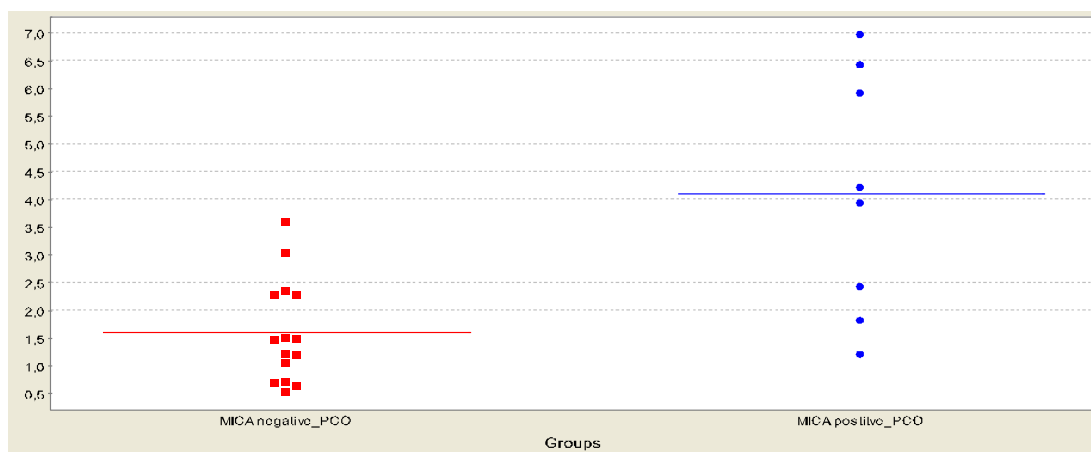


Figura 33. En pacientes con ovarios poliquísticos la expresión de la proteína de 8577 Dalton es mayor cuando además se expresa MIC. $p=0,005$.

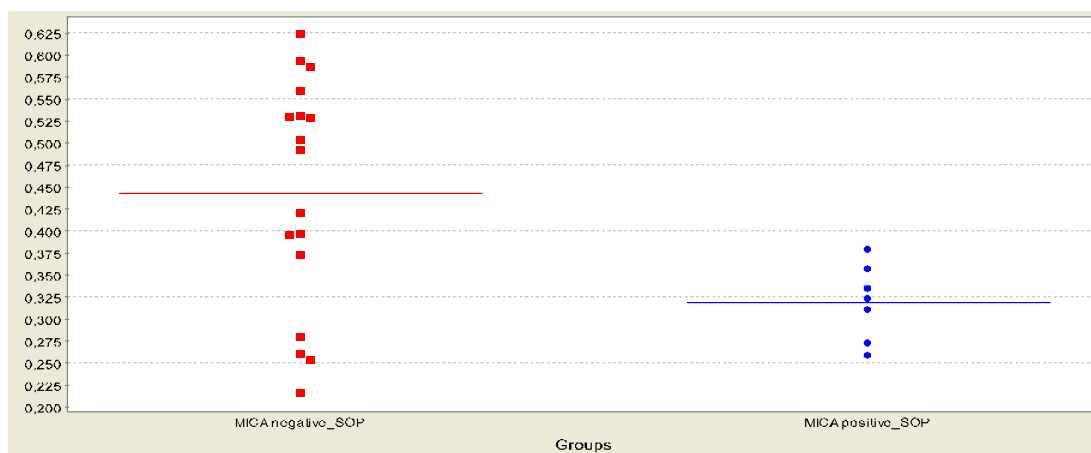


Figura 34. La expresión de la proteína de 37145Da en pacientes con ovarios poliquísticos es mayor cuando no se detecta MIC, $p=0,033$.

b) MIC y proteómica de la endometriosis

En pacientes con endometriosis la proteína de 8014 Dalton se detectó con mayor intensidad cuando MIC fue positivo $p=0,009$ (**figura 35**). Sin embargo la proteína de 59674 tuvo mayor expresión en pacientes sin MIC $p= 0,043$ (**figura 36**).

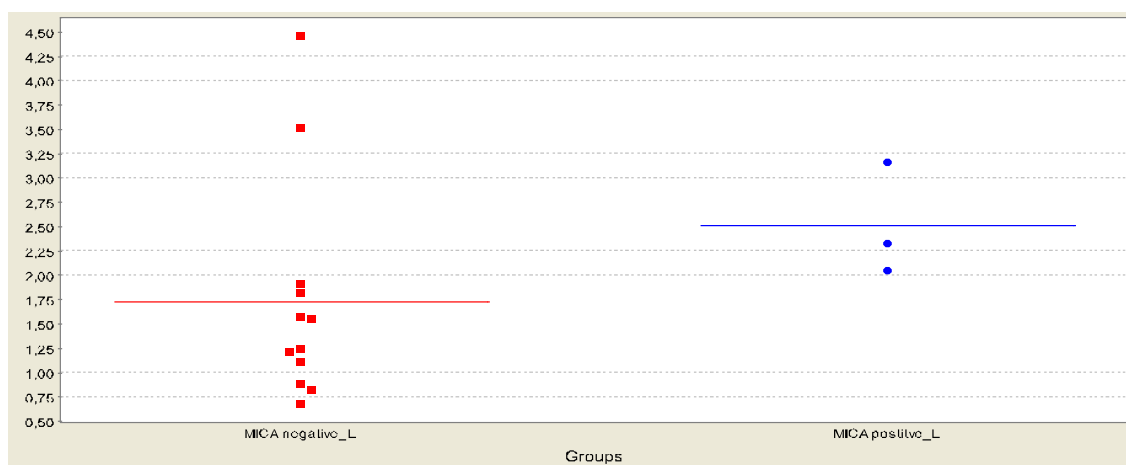


Figura 35. En pacientes con endometriosis la proteína de 8014 Dalton se detectó con mayor intensidad cuando MIC fue positivo $p=0.009$.

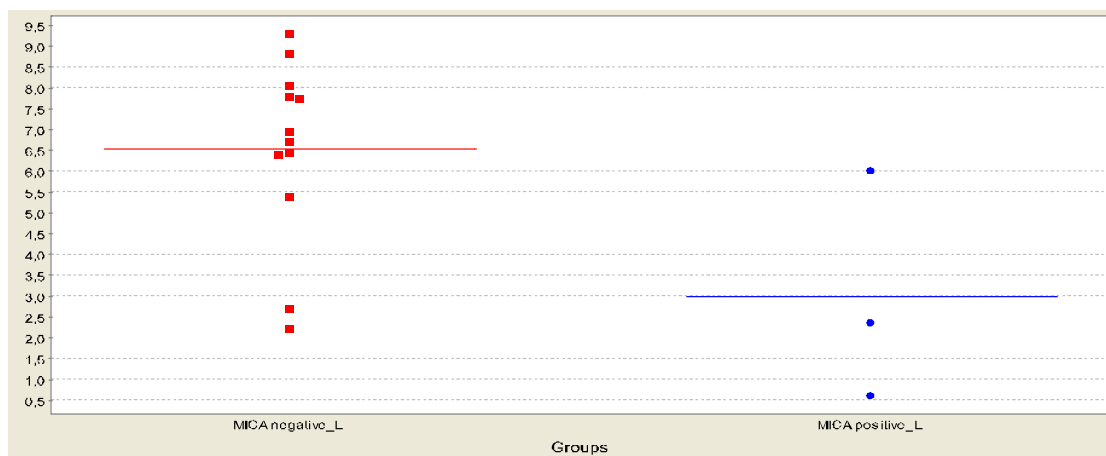


Figura 36. En pacientes con endometriosis la expresión de la proteína de 59674 Dalton es menor cuando también se expresa MIC $p=0.043$.

c) Factor etario

En pacientes con factor etario existe menor expresión de la proteína de 14132Dalton cuando se detecta MIC, $p=0.037$ (**figura 37**)

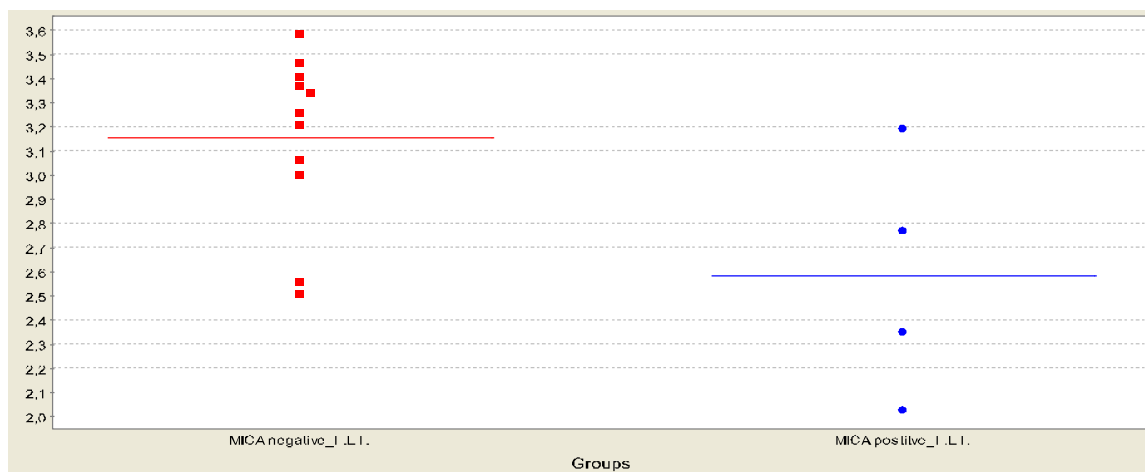


Figura 37. Expresión de 14132 Dalton en pacientes con factor etario en función de MIC.

d) En donantes

En el líquido folicular de donantes de óvulos encontramos 3 proteínas cuya expresión está aumentada cuando se detecta MIC: la de 6185Dalton; $p=0,032$ (**figura 38**), la proteína de 39810Dalton; $p=0,029$ (**figura 39**) y la proteína de 66700Dalton; $p=0,044$. Este último peso molecular corresponde a la albúmina (**figura 40**).

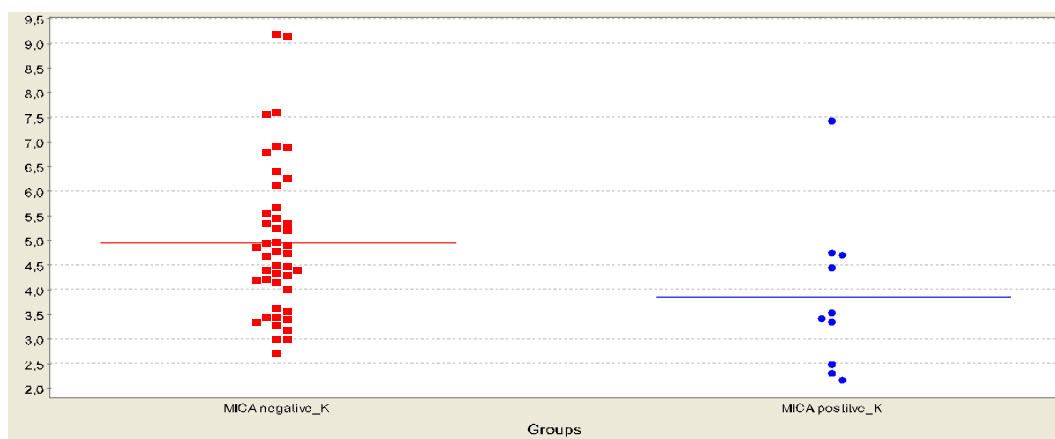


Figura 38: expresión de la proteína de 6185 Dalton en función de MIC; $p=0,032$.

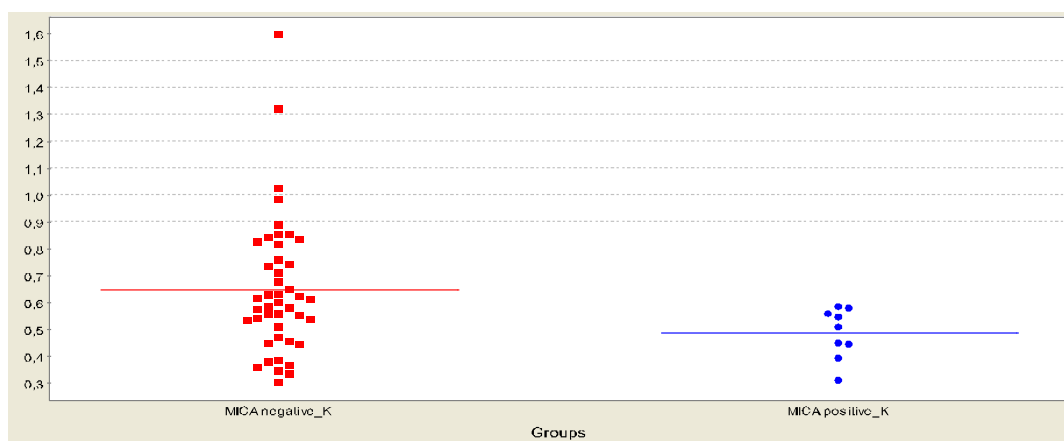


Figura 39: expresión de la proteína de 39810 Dalton en función de MIC; $p=0,029$.

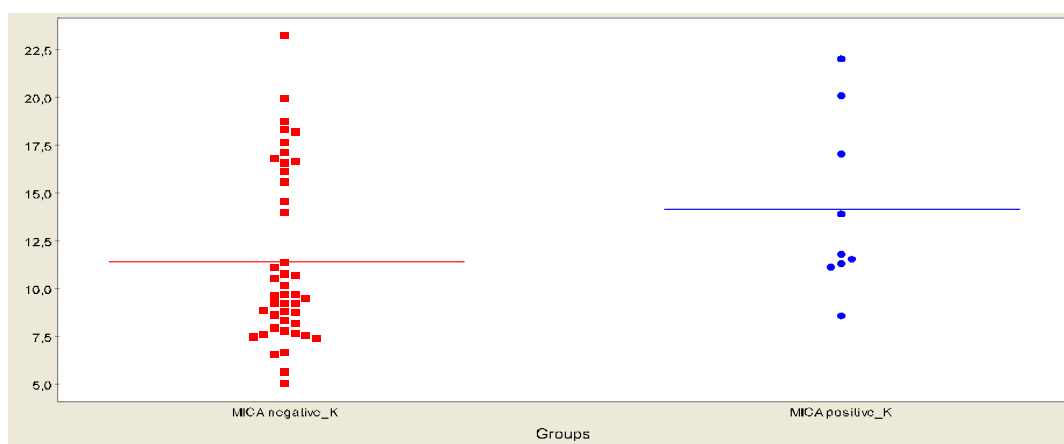
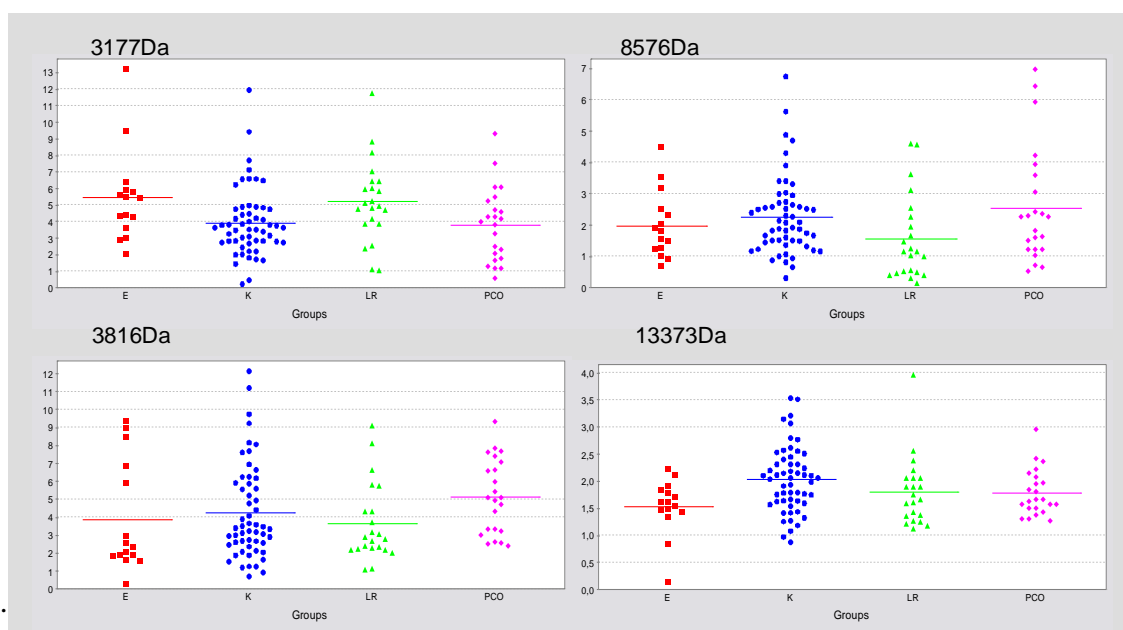


Figura 40: En donantes, la expresión de la proteína de 66700 Dalton es mayor cuando se detecta MIC $p=0,044$. Este peso molecular corresponde a la albúmina.

e) Otras asociaciones entre el perfil proteómico y la respuesta ovárica:

El análisis proteómico comparativo mostró un patrón significativamente diferente entre los 4 grupos de pacientes: donantes, síndromes de ovarios poliquísticos, endometriosis y bajas respondedoras. Entre estos 4 grupos hubo expresión diferente de 4 proteínas de 2 a 20KDa (**figura 41**) y de 5 de 20 a 200KDa (**figura 42**).



p-value	M/Z average	Intensity average
0,014	3177	4,3
0,020	13373	1,9
0,048	8576	2,1
0,049	3816	4,3

Figura 41. Diferente expresión de proteínas de < 20KDa en los 4 grupos

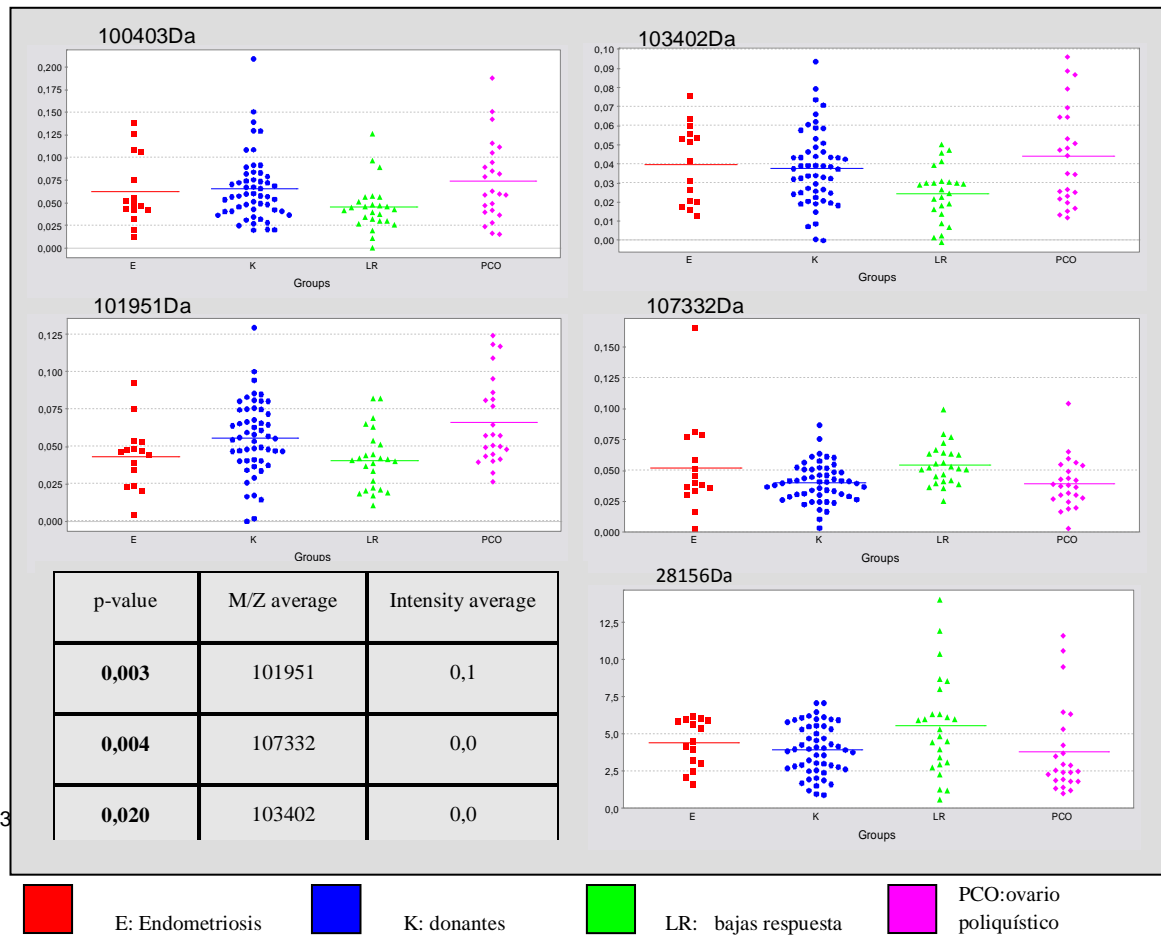


Figura 42. Diferente expresión de proteínas de > 20KDa en los 4 grupos

Entre donantes y bajas respondedoras se encontró diferente expresión de 9 proteínas de 2 a 20KDa y 11 proteínas de más de 20KDa (**figura 43a, 43b ,43c**).

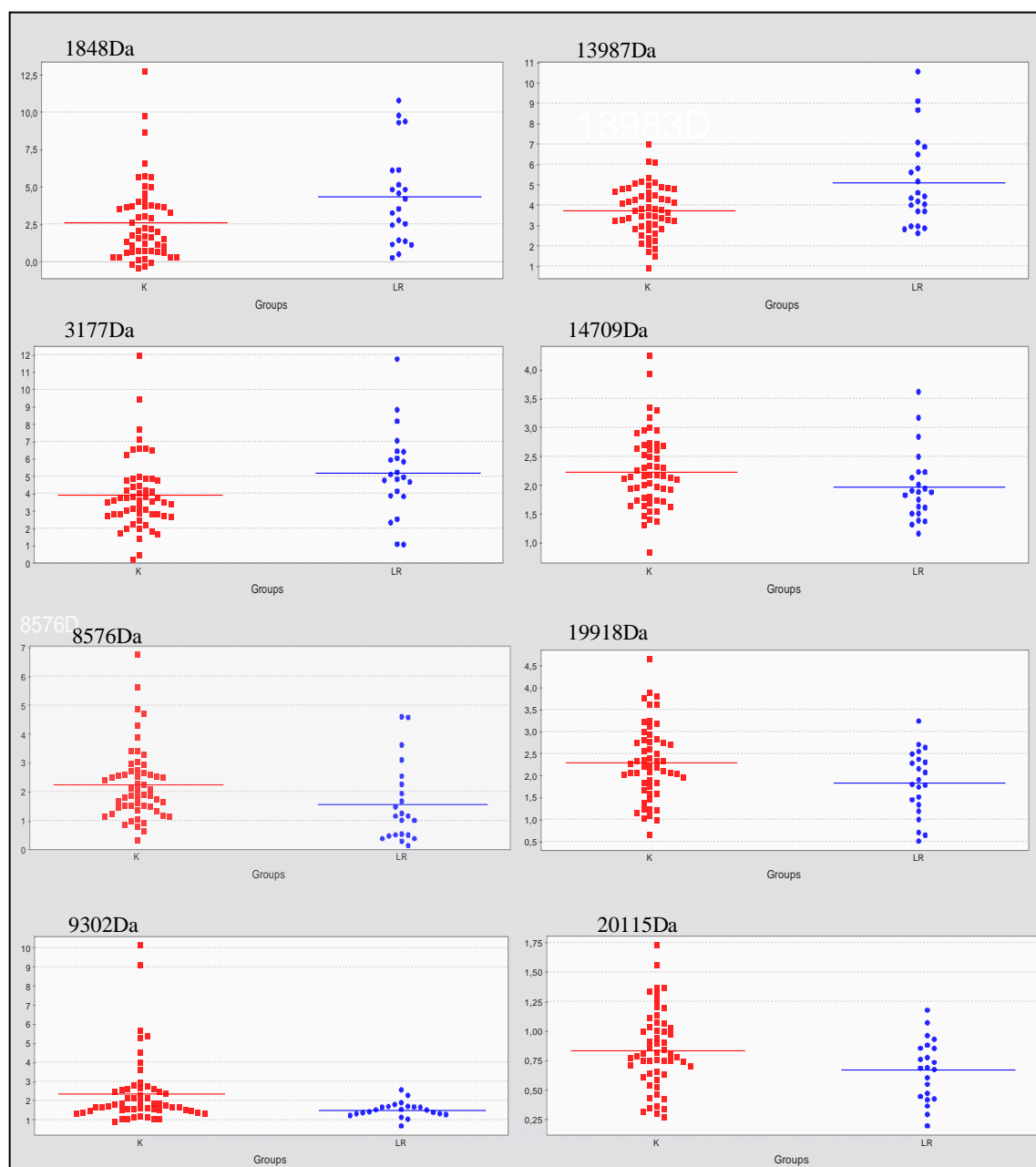


Figura 43 a.

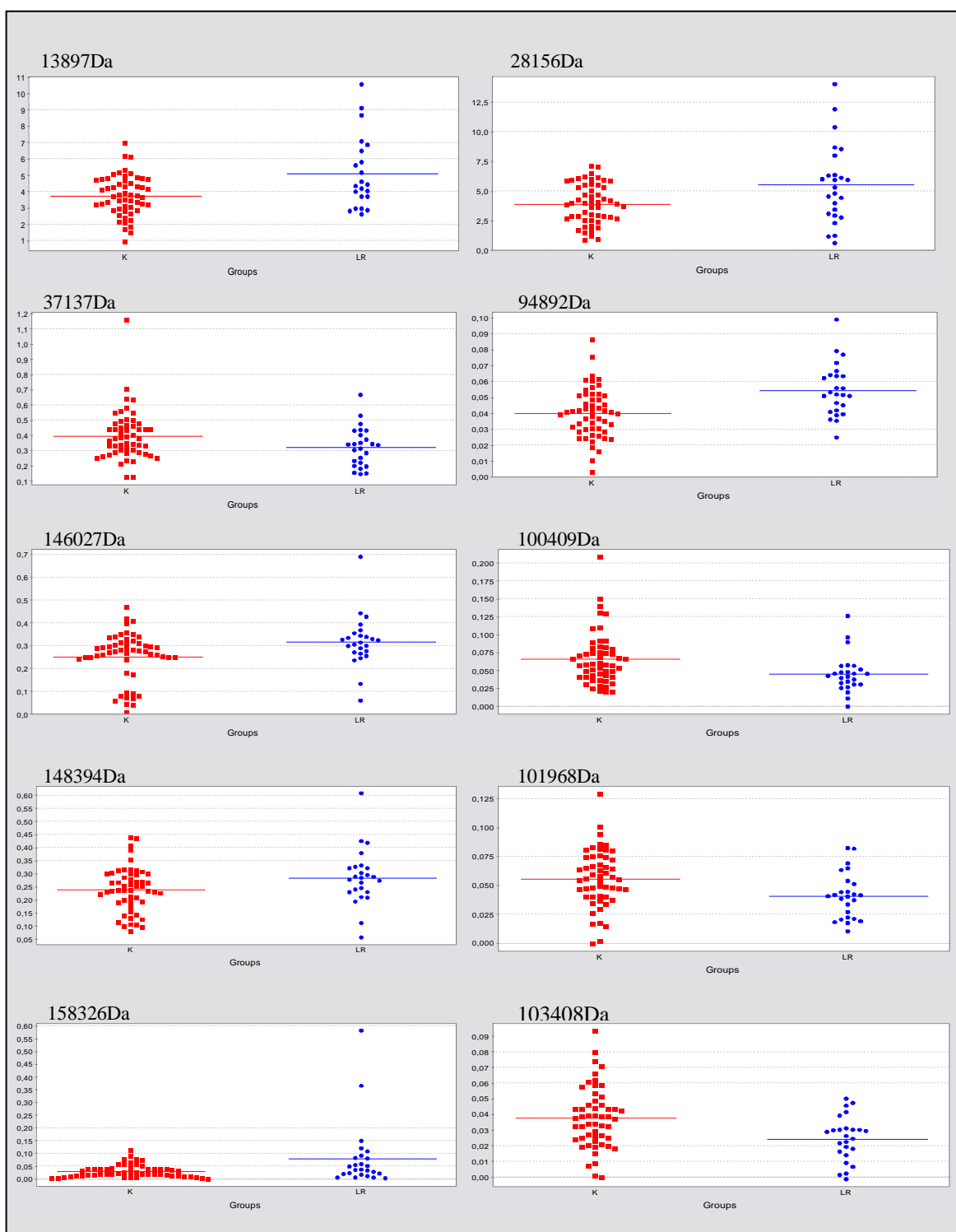
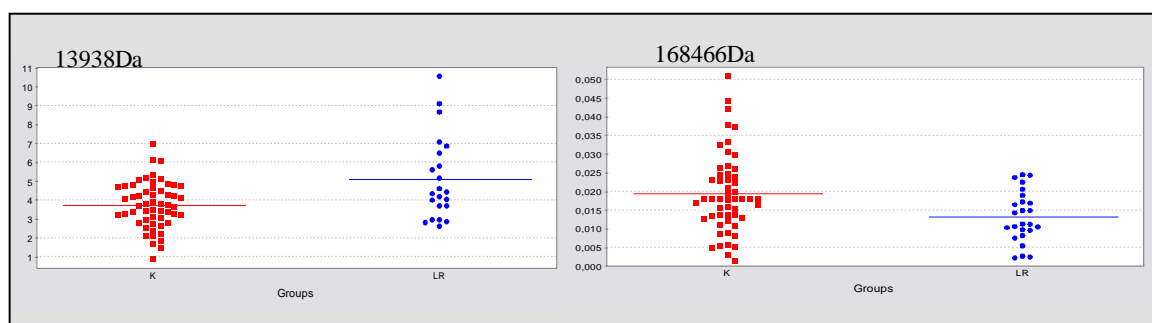


Figura 43b



ZZp-value	M/Z average	Intensity average
0,009	8576	2,1
0,010	3177	4,3
0,017	9302	2,1
0,018	13897	4,1
0,021	1848	3,1
0,034	13938	2,1
0,042	19918	2,2
0,046	14709	2,2
0,048	20115	0,8

p value	M/Z average	Intensity average
0,0004	107317	0,04
0,0048	103408	0,03
0,0053	100409	0,06
0,0078	101968	0,05
0,0110	168466	0,02
0,0193	146027	0,27
0,0286	158326	0,04
0,0354	94892	0,07
0,0363	28156	4,44
0,0403	37137	0,37
0,0458	148394	0,25



K: donantes



LR: baja respuesta

Figura 43 c. Diferente expresión proteica entre donantes y bajas respondedoras

Se detectó distinto patrón proteómico en 4 proteínas entre pacientes con endometriosis y donantes (**figura 44**).

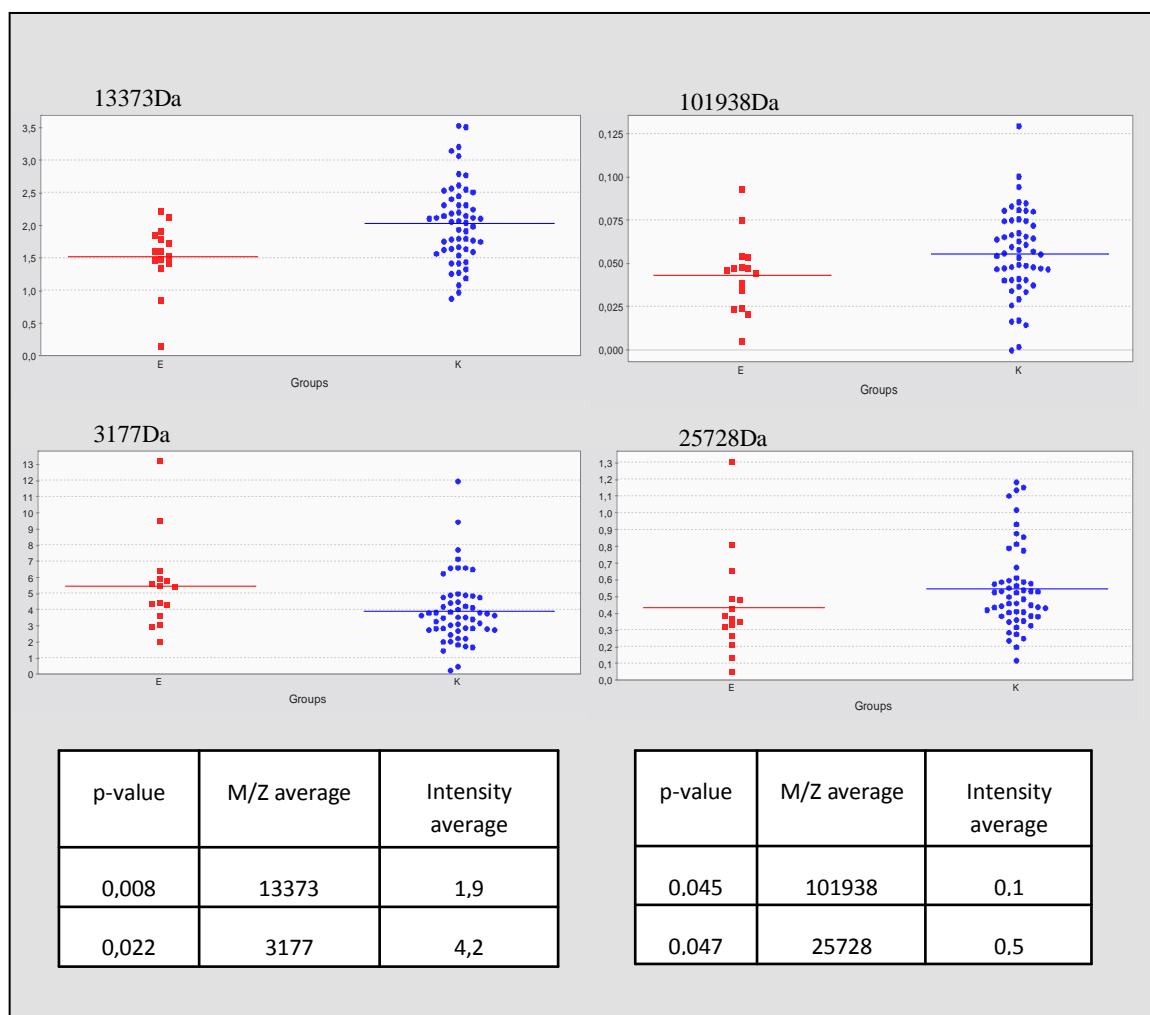


Figura 44. Diferente expresión proteica entre donantes y endometriosis

La expresión de proteínas específicas del líquido folicular como P1 y P2 se asoció con mayor edad. P4 y P5 se asociaron con pacientes más jóvenes. También se encontró relación significativa entre la expresión de estas proteínas y los niveles de FSH, estradiol, el número de ovocitos recuperados y los embriones obtenidos (**figura 45**).

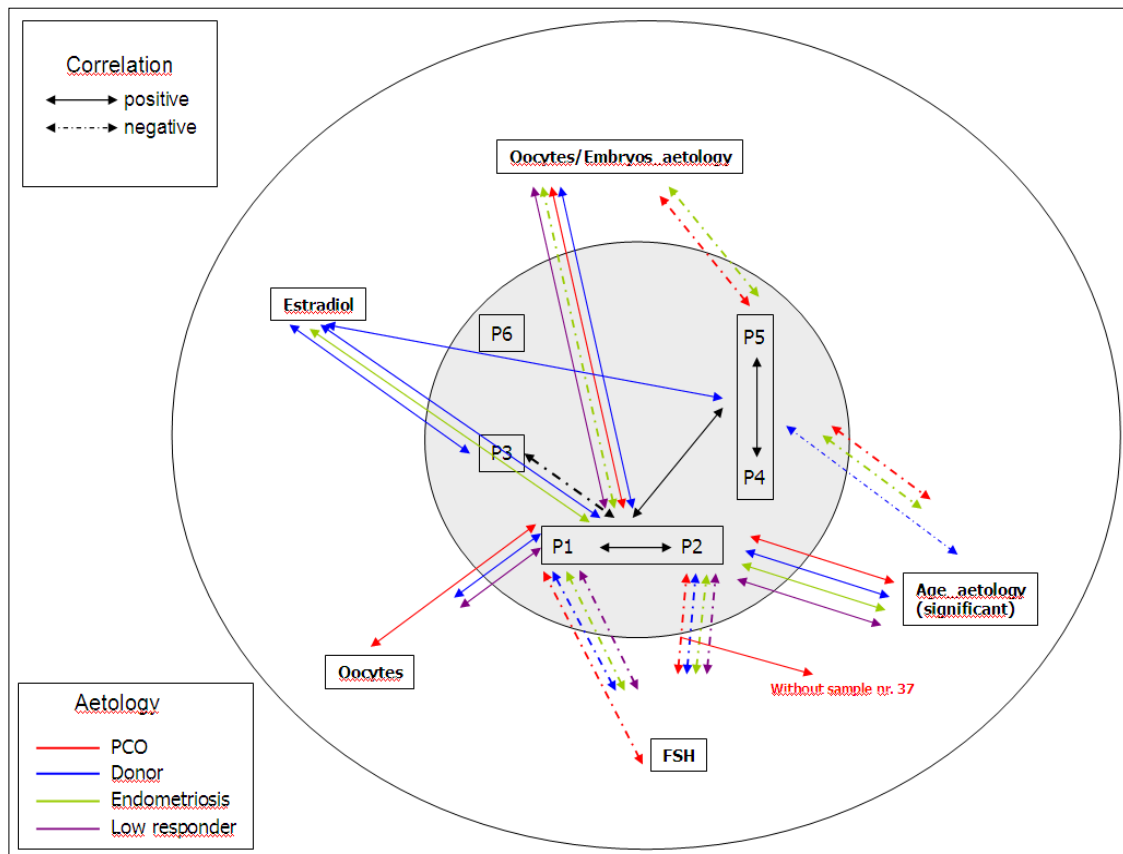


Figura 45. Asociaciones de proteínas específicas del líquido folicular.

DISCUSIÓN

1. Existencia de MIC en el líquido folicular

Que sepamos, esta es la primera vez que se describe la presencia de la molécula MIC o MICA/B en el líquido folicular. La frecuencia con la que se detecta MIC en el líquido folicular es similar a la frecuencia con la que se detecta MIC en suero, e incluso es más frecuente en el líquido folicular que en el suero, 73/216 (33.79%) frente a 26/148 (17.57%). Esto sugiere que la presencia de MIC folicular podría no deberse a contaminación sanguínea.

Parece que la membrana granulosa es relativamente permeable, ya que existen un gran número de proteínas séricas en el líquido folicular [98], pero si el MIC folicular procediese del plasma sería esperable que estuviese más diluido, por tanto en menor concentración, y sin embargo esto no sucede.

Por otra parte, parece existir acuerdo en que el MIC de membrana es liberado por acción de metaloproteasas [23]. Si las células del folículo participan en la secreción de MIC folicular sería esperable encontrar metaloproteasas en el líquido folicular. En este sentido es relevante una reciente publicación que pone de manifiesto la presencia de BMP-1 en el líquido folicular. BMP-1 es una metaloproteasa que se ha encontrado en concentraciones proporcionales a la madurez folicular [99].

2. Expresión sérica de MIC

El origen de MIC sérico continúa siendo parcialmente desconocido. Células inmunes como los linfocitos T CD4 son capaces de producirlo, pero la regulación de esta secreción continúa siendo objeto de numerosos estudios. Parece que la infección crónica por el HIV de los linfocitos T CD4 aumentaría esta producción [100]. Como hemos visto previamente, se ha detectado una sobreexpresión de MIC en tumores epiteliales y hematológicos [73, 41, 22]. También se ha relacionado su expresión con el rechazo a transplantes renales [101].

Respecto al posible efecto del embarazo y las técnicas de reproducción asistida sobre los niveles de MIC los resultados continúan siendo muy contradictorios. Mincheva [24] describe que en controles, es decir, mujeres fértiles no gestantes, no se detectan niveles superiores a 32 pg/ml. Tamaki [22] sitúa el punto de corte en 50 pg/ml, en consonancia con el resultado de Mincheva [24]. Sin embargo, Porcu-Bouisson [26] describe una media de 365pg/ml en controles y de 935pg/ml en pacientes infértiles antes de ser sometidas a estimulación de la ovulación. Por el contrario nosotros hemos observado una media de 722 pg/ml en suero después de realizar todo el tratamiento, estimulación de la ovulación, punción y transferencia embrionaria. Este valor es por tanto intermedio entre pacientes controles y pacientes infértiles y en cualquier caso superior a los valores descritos en controles. Sin embargo, para entender porqué mecanismos la estimulación de la ovulación podría afectar a los niveles de MIC serían necesarios estudios ulteriores.

3. MIC y Técnicas de Reproducción Asistida

También llama la atención que Porcu-Bouisson [26] detecta MIC en el 38% de las pacientes infértiles antes de iniciar el ciclo de FIV, mientras que nosotros solo detectamos MIC en 20,2% del total de las pacientes. Dentro de éstas, las que realizaron un ciclo de FIV con óvulos propios expresaron MIC en el 18%, mientras que las que recibieron óvulos de donantes y por tanto solo fueron tratadas con estrógenos para preparar el endometrio, expresaron MIC en el 33% de los casos. Estas diferencias no fueron significativas, pero el hecho de que los ciclos de FIV tiendan a menor expresión de MIC podría tener relevancia clínica. En cualquier caso es importante insistir en que no hay una asociación estadística y que tampoco se encontró relación entre las dosis de gonadotropinas administradas y la expresión de MIC. Recientes publicaciones sugieren que la estimulación de la ovulación es capaz de alterar el equilibrio inmunológico de la ovogénesis y de receptividad endometrial, encontrándose incluso distinto perfil de citoquinas en ciclos estimulados frente a ciclos naturales [102].

4. MIC en el sobrenadante de cultivo embrionario

La mayor parte de los estudios hasta ahora sugerían que los embriones de buena calidad serían capaces de secretar algún factor capaz de silenciar la respuesta inmunológica materna [69], entre ellos se ha propuesto HLA-G de forma más importante, como expusimos previamente. Según varios autores, los embriones con más expresión de HLA G presentarían mayores tasas de implantación [54, 70,71]. Sin embargo, estos resultados no han podido ser contrastados. Nosotros planteamos la hipótesis de que este factor podría ser MIC, pero esta molécula no ha podido ser detectada en ninguno de los sobrenadantes de cultivo embrionario analizados. Ni siquiera mediante la acumulación de varios sobrenadantes de 25 microlitros que en teoría deberían estar más concentrados se pudo detectar. Tampoco se detectó MIC en el sobrenadante de blastocistos que, en principio, tienen mayor grado de diferenciación. Estos resultados apoyan la reciente teoría de Teklenburg [103], según la cual el embrión silente sería el que mejor se implanta. Este autor defiende que en principio no existe una secreción específica de ningún factor por parte del embrión, salvo de hCG. Los embriones tenderían a la mínima expresión metabólica de modo que el propio endometrio rechazaría a aquellos que interprete como alterados. Los criterios que utilice el endometrio para discriminar estos embriones continúan siendo desconocidos pero en co-cultivo de blastocistos y células endometriales decidualizadas, los embriones que evolucionan, sólo producen una ligera disminución de la IL-5 mientras que los que se detienen producen inhibición de IL-1 β , -6, -10, -17, -18, exotaxina y HBEGF [103]. Según esto, se implantarían mejor los embriones metabólicamente más inactivos y que desencadenan una menor reacción

inmunológica. Parece por tanto que según nuestros resultados, el ovocito sería capaz de producir MIC mientras que el embrión no. Esto apoya la teoría de que existe un periodo de unas 48 horas postfertilización durante el cual el genoma embrionario estaría silenciado y el mRNA procedería del ovocito [104]. A partir de aquí podría empezar a sintetizar sus propias proteínas pero aunque fuese capaz de sintetizar de nuevo MIC probablemente no consiga secretarlo en fase preimplantacional. En las primeras etapas del desarrollo embrionario existe un especial control de imprinting genético a través de micro RNA que modifican por cambios epigenéticos la expresión proteica para evadir el sistema inmunológico materno [105,106].

5. MIC y reserva ovárica

Hemos observado que las pacientes que expresan MIC en suero presentan una mayor reserva ovárica. Estas pacientes tienen menores niveles de FSH y mayor recuento de folículos antrales. A su vez, respondieron a la estimulación con gonadotropinas produciendo un mayor número de ovocitos. El número de embriones obtenido fue algo superior aunque la diferencia no fue significativa. Pensamos que esto puede deberse al factor masculino, ya que este influye de forma muy importante en las tasas de fertilización y en desarrollo embrionario [107].

Sin embargo la presencia de MIC en el líquido folicular parece tener el efecto opuesto. Las pacientes con MIC folicular tuvieron peor reserva ovárica, niveles de FSH mayores, menores niveles de estradiol y edades más avanzadas (**tabla 17**). En este caso la diferencia en el recuento de antrales no resultó significativa. Tampoco encontramos diferencias en cuanto al número de ovocitos o embriones obtenidos. Este efecto ambivalente de MIC ya ha sido descrito previamente. Algunos autores como Tamaki describen que es capaz tanto de bloquear como de activar el sistema inmunológico [22]. Según este autor esto dependía de si se trata de la forma soluble o la anclada a la membrana. En cualquier caso tiene una función distinta dependiendo de su ubicación. Parece que en el líquido folicular podría influir en la maduración folicular y en la respuesta a las gonadotropinas o simplemente ser expresión de una peor reserva ovárica. Aunque existen múltiples intentos de encontrar factores inmunológicos en la maduración ovocitaria y respuesta ovárica [108], que sepamos esta es la primera vez que un factor inmunológico guarda una relación tan clara con la reserva y respuesta ovárica humana.

MIC	Reserva ovárica			Respuesta ovárica		
	FSH	Antrales	Edad	Ovocitos	Embriones	Estradiol
suero	-	+	NS	+	NS	NS
L.F.	+	NS	+	NS	NS	-

Tabla 17: asociaciones de MIC y reserva ovarica

La baja reserva se puede dividir en dos grupos: la dependiente de la edad o fisiológica y la prematura o no fisiológica. Este segundo caso incluiría a mujeres jóvenes con ciclos regulares normales pero menos de 5 folículos antrales y/o $>10\text{mUI/ml}$ de FSH. Se ha visto que éstas tienen una respuesta a las gonadotropinas disminuidas y se ha denominado fallo ovárico oculto. En nuestro estudio este grupo representa más del 19% de las pacientes. Debido a la gran variación en la prevalencia de insuficiencia ovárica dependiendo de la edad, no hay un límite o umbral adecuado para ninguno de los test de screening de reserva ovárica. La adecuada interpretación de un test de screening de reserva ovárica en pacientes candidatas a Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) es muy importante ya una pobre reserva ovárica se asocia a escasas posibilidades de conseguir gestación. La existencia de pacientes con fallo ovárico oculto justifica la búsqueda de nuevos parámetros que ayuden a valorar dicha reserva Técnicas de Reproducción Asistida [109]. En este sentido, resulta prometedor el papel de MIC como nuevo marcador de reserva ovárica y predictor de respuesta a los tratamientos de estimulación de la ovulación con gonadotropinas.

6. Relación entre MIC folicular y los niveles de estradiol

Puesto que la síntesis de estradiol se produce fundamentalmente por las células de la granulosa foliculares, el hecho de que la presencia de MIC folicular se asocie a menores niveles de estradiol plasmático refuerza la hipótesis de que MIC cumple un papel fundamental en el microambiente folicular. Estos menores niveles de estradiol probablemente también guarden relación con el menor desarrollo folicular que se asocia a la presencia de MIC folicular. Se ha planteado que el ambiente folicular de las bajas respondedoras no difiere del de las altas respondedoras y que, por folículo, la actividad de la granulosa y los niveles de estradiol son similares [110]. Según esto, si admitimos la síntesis folicular de MIC, un menor desarrollo folicular se debería asociar a menores niveles foliculares y sin embargo según nuestros resultados, ocurre lo contrario. Parece que el microambiente folicular y las interacciones inmunes y endocrinas a este nivel son más complejas. El mecanismo por el que MIC influiría en el desarrollo folicular continúa siendo desconocido, pero su asociación a los niveles de estradiol sugieren el posible papel inmunomodulador de los estrógenos. Este efecto inmunomodulador de los estrógenos ha sido descrito en numerosos trabajos. Los estrógenos son capaces de inducir un fenotipo de lupus en ratones, aumentan los niveles de anticuerpos anti-ADN y alteran la capacidad de selección negativa o eliminación de las células B autorreactivas [105]. Se ha visto que las células T reguladoras CD4(+)CD25(alto) que están implicadas en el mantenimiento del embarazo en murinos están disminuidas en el segundo trimestre del embarazo en humanos. Esta situación pudo ser reproducida in Vitro mediante la administración de estrógenos y progesterona. Este hecho sostiene que las

hormonas son importantes reguladoras de la inmunidad y de las células T durante la gestación [112]. Incluso se ha descrito que los estrógenos son capaces de inducir apoptosis de neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo hipotalámico [113]. La galectina que es una lectina que se une a la β -galactosidasa e inhibe la respuesta inmunológica. Se ha visto que la galectina juega un papel fundamental en el desarrollo de tolerancia inmunológica maternofoetal [114] y que su expresión también está regulada por los niveles de estrógenos [115].

7. MIC sérica y etiología de la infertilidad

Las pacientes con ovários poliquísticos, normorrespondedoras y donantes presentaron expresión de MIC sérica con mayor frecuencia que las pacientes con endometriosis y factor etario. Este resultado es esperable puesto que las primeras corresponden a normo y alta respondedoras. Los ovarios poliquísticos por definición son alta respondedoras, ya que un número de folículos antrales mayor de 10 es uno de los criterios de Rotterdam para su diagnóstico [116]. El recuento de más de 5 antrales por ovario también es un criterio para la selección de donantes en nuestro centro. Los factores masculino y tubárico puros también consideramos tener al menos 5 antrales y menos de 10mU/ml de FSH, porque si no los hubiésemos clasificados como factores mixtos.

En el otro grupo estarían las bajas respondedoras ya sea por factor etario, fallo ovárico precoz o fallo ovárico oculto. Para su diagnóstico se consideró recuento de folículos antrales menor de cinco y/o más de 10mU/ml de FSH. La endometriosis disminuye también la reserva ovárica porque suele afectar a tejido ovárico sano, sin embargo, del total de todas las endometriosis estudiadas (39), incluyendo el análisis líquido folicular y de suero, hubo 6 con un recuento de antrales igual o superior a cinco. Es decir el 12,82% presentaban aparentemente una reserva ovárica normal. Sin embargo, la reducción del parénquima ovárico sano por los endometriomas no es el único mecanismo que reduce la respuesta ovárica y empeora los resultados de FIV en la endometriosis. La endometriosis altera la dinámica ovárica, la estructura ovocitaria postovulación y el desarrollo embrionario. El mecanismo es desconocido pero parece

que en el líquido folicular de las pacientes con endometriosis estaría alterada la expresión de metaloproteinasas [117]. No podemos olvidar que el origen del MIC soluble parece ser el derivado del efecto proteolítico de las metaloproteinasas sobre el MIC de membrana [23]. El hecho de que estén alteradas en la endometriosis podría explicar también que estas pacientes tengan más MIC folicular y menos MIC sérica. La relación de la expresión de MIC con la etiología de la infertilidad sugiere además un papel inmunomodulador en la ovogénesis.

8. MIC e implantación

Puesto que las pacientes con MIC sérica presentan un mayor número de ovocitos cabría esperar un mayor número de embriones y unas mayores tasas de implantación. Sin embargo observamos que aunque el número de embriones es ligeramente superior (3,11 versus 1,77) estas diferencias no resultaron significativas. Tampoco se encontraron diferencias en relación con la expresión de MIC folicular. La tasa de implantación cuando MIC está presente en suero también es ligeramente superior que cuando no se detecta (45,16% versus 40,52%). De nuevo estas diferencias no fueron significativas. Estos resultados corroboran la hipótesis defendida por Papageorgiou, según la cual la respuesta ovárica no se asocia proporcional y significativamente a las tasas de gestación. No hay que olvidar que el factor masculino y la receptividad endometrial también son determinantes de la implantación embrionaria [119]. Estos resultados son claramente contradictorios con el trabajo de Porcu-Buisson [26]. Este propone la determinación de MIC sérico como un marcador de implantación y sugiere que niveles mayores de MIC se asocian a peores tasas de implantación. Nuestros resultados más bien sugieren lo contrario, y aunque no son significativos apoyan más la teoría de Mincheva [24], según la cual, MIC sería un factor positivo o favorable para la implantación. Según nuestros resultados, el utilizar MIC sérico como predictor de implantación tiene una especificidad del 79,38%, lo que sugiere que cuando la implantación es negativa es menos probable encontrar MIC sérica, sin embargo la escasa sensibilidad y la ausencia de relaciones significativas desaconsejan el empleo de MIC sérica como marcador de gestación.

9. MIC folicular y calidad embrionaria

Hemos podido observar que las pacientes con MIC folicular presentan una mayor proporción de embriones de primera categoría frente a los de segunda. No hay diferencia sin embargo, con los de primera y segunda respecto a los de tercera y cuarta. Parece por tanto, que cuando el embrión es de categoría óptima la presencia de MIC folicular hace que estos sean aún mejores. En otras palabras, la presencia de MIC folicular hace que se optimicen los resultados, aunque no aumenta el total de embriones buenos. Este resultado llama la atención porque la presencia de MIC folicular también se asocia a menor respuesta ovárica y menores niveles de estradiol. Todo esto refuerza la idea que no sólo es importante un número adecuado de ovocitos y embriones, sino también la calidad de los mismos. La tendencia es precisamente recomendar la estimulación suave o mild stimulation porque parece que el exceso de respuesta ovárica puede ir en detrimento de la calidad ovocitaria y embrionaria [120]. Además se ha visto que el exceso estrógenos como consecuencia de altas dosis de gonadotropinas inhibe la formación de los pinópodos y conducen a la expresión aberrante de un número importante de genes implicados en la implantación [121].

A su vez, como hemos expuesto unos niveles de estradiol excesivamente altos disminuyen la receptividad endometrial [119]. Estos resultados sugieren también la necesidad de un equilibrio inmune y endocrino y que cada molécula precisa su justa proporción para que sea posible la implantación. Resultados similares se han encontrado por ejemplo con el LIF. Cuando este se bloquea se inhibe la implantación hasta tal punto que esto ha sido propuesto como método anticonceptivo [122]. Sin embargo, niveles excesivamente altos de LIF también disminuyen las tasas de implantación [60].

10. MIC y proteómica folicular

El gran polimorfismo de MIC justifica el abordaje proteómico de los líquidos foliculares. En primer lugar para identificar isoformas de MIC no detectadas por ELISA y en segundo lugar para evaluar su posible interrelación con otras proteínas foliculares. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un complejo equilibrio folicular en la que la expresión de unas proteínas modifican las de otras y todas influyen en el microambiente necesario para el desarrollo ovocitario. La existencia de MIC se relaciona inversamente con los niveles de la 6680Dalton. La expresión de MIC modifica el patrón proteómico de los cuatro grupos en 2 proteínas. Analizando cada subgrupo la expresión de MIC condiciona un distinto patrón proteómico de otras 8 proteínas.

Cabe preguntarse cuál de estas proteínas identificadas por el SELDI-TOF corresponden a MIC. MIC es una proteína de unos 62 KDalton pero muy polimórfica [123]. La proteína de las estudiadas que más se parece en cuanto a peso molecular es la de 66.700 Dalton. Esta se ha relacionado con la albúmina cuyo peso molecular está entre 66.000 y 67.000 Dalton. Sin embargo, curiosamente observamos que las donantes con MIC presentan niveles de albúmina significativamente mayores. Esto nos lleva a pensar que probablemente este excedente de albúmina corresponda a MIC. La técnica del SELDI-TOF presenta el principal problema de no poder identificar proteínas y puede confundir aquellas de peso molecular similar. Por ello hacen falta estudios posteriores que completen el conocimiento de MIC en la inmunología de la reproducción.

11. Otras asociaciones de la proteómica folicular

Al igual que existe diferente expresión de MIC folicular en función del tipo de reserva-respuesta ovárica encontramos diferente expresión de otras muchas proteínas aunque estas aún necesitan ser identificadas. Encontramos 11 proteínas con expresión significativamente diferente en los 4 subgrupos: SOP, donantes, normorrespondedoras, endometriosis y baja respuesta. Las donantes como prototipo de ovario sano y de alta respuesta presentan un perfil completamente distinto de las pacientes con baja respuesta y la endometriosis. Encontramos expresión diferencial de 20 proteínas entre donantes y bajas respondedoras y 4 proteínas entre donantes y endometriosis. Las pacientes con ovarios poliquísticos sin embargo presentan un perfil proteico muy similar a pesar que es sabido que presentan problemas de maduración ovocitaria [124]. Esto sugiere, al igual que el estudio de Rubio, que altas dosis de gonadotropinas en donantes con alta respuesta puede afectar a la calidad ovocitaria en cuanto a tasas de fertilización y blastocistos aneuploides [125]. En donantes, el riesgo de hiperestimulación ovárica se minimiza porque desencadenamos la ovulación con análogos de la GnRH. De este modo las donantes pueden recibir mayor dosis de gonadotropinas y tener una respuesta ovárica asimilable a la que tendría una paciente con ovario poliquístico. Esto podría explicar la similar expresión proteómica de ambos grupos.

Parece que existen proteínas asociadas a una mayor respuesta ovárica como las P1 y P2 específicas del líquido folicular y las 24 que se expresan de forma diferencial en donantes. Estas se relacionan con un mayor número de ovocitos, mayores tasas de

fertilización, y menores niveles de FSH. Otras proteínas sin embargo, se asocian a peor respuesta ovárica como la P4 y la P5.

De nuevo observamos que en la endometriosis el ambiente folicular está alterado de forma independiente a la reserva ovárica, y que en la endometriosis proteínas que teóricamente son beneficiosas como P1 y P2 se asocian a peores tasas de fertilización. Las proteínas de expresión diferencial entre donantes y bajas respondedoras son distintas de las diferenciales entre endometriosis y donantes.

Aunque existen otros intentos de conocer el microambiente folicular a través de la proteómica [126], que sepamos este es el primer estudio que relaciona de manera tan clara la función ovárica y la etiología de la infertilidad con el patrón proteómico.

12.MIC en la inmunología folicular

La ovulación se considera un proceso inflamatorio que se caracteriza por la migración de leucocitos a los folículos ováricos. Según Hammadeh, se han demostrado importante migración de leucocitos y macrófagos en el folículo durante la ovulación y la formación del cuerpo lúteo [77]. Cada vez se le da más importancia a los factores intraováricos que regulan el efecto de las gonadotropinas sobre la maduración folicular. El estudio del líquido folicular resulta interesante porque el microambiente del folículo es fundamental para el normal desarrollo del ovocito, la foliculogénesis y la ovulación. En segundo lugar, el líquido folicular ha demostrado mejorar el desarrollo in vitro de embriones humanos [77]. Sin embargo, aunque parece claro que existe una regulación inmunológica del folículo ovárico, no todos los autores están de acuerdo en la presencia de células inmunes en el folículo. Herath, entre otros, sostiene que no existen células inmunológicas dentro del folículo y que son las propias células de la granulosa las que poseen propiedades inmunes que incluso regulan la función endocrina de los folículos [127]. Los estrógenos cumplen una función principal en el crecimiento y desarrollo folicular [128]. Infecciones como la ocasionada por E coli o el virus Cocksackie B en mamíferos puede causar infertilidad al menos en parte por la alteración de la función ovárica y la supresión de la síntesis de estradiol consiguiente [129]. Las células de la granulosa producen estradiol por aromatización de la androstendiona producida en la TECA bajo regulación de gonadotropinas como la FSH. Muchos de los efectos de E. coli están mediados por la unión del lipopolisacárido de membrana LPS al receptor TLR4, al CD14 o al MD2 de las células inmunes. Sin embargo, según muchos autores no existen células inmunes dentro del folículo y según Herath, serían las propias células de la granulosa las que expresarían este receptor TLR4 y E. coli directamente inhibiría

la secreción de estradiol por la unión del LPS al TLR4 de las células de la granulosa [127]. En cultivos celulares se ha visto que cuando se exponen células de la granulosa a LPS, la secreción de estradiol disminuye aunque la producción de androstendiona por la teca se mantiene. Esta disminución en la producción de estradiol se ha asociado a una disminución de la transcripción de aromatasa y no afecta a la supervivencia celular. Además, se ha visto que las células de la granulosa transcriben TLR4, CD14 y MD-2 a lo largo de los estadios fundamentales del crecimiento y desarrollo folicular. Parece por tanto que las células de la granulosa tienen la capacidad inmunológica de detectar infección bacteriana y que esta infección bacteriana altera el crecimiento y función folicular por alteración de la esteroidogénesis [127]. Por tanto, existe una regulación inmunológica del funcionamiento folicular y su alteración empeoraría la calidad ovocitaria. La disminución de las tasas de fertilización y de implantación en pacientes con endometriosis precisamente ha sido explicada al menos en parte por un desequilibrio inflamatorio en el líquido folicular. Se ha visto que en líquido folicular de las pacientes con endometriosis las concentraciones de IL-1 β , IL-6; IL-8 y TNF α es mayor que en los controles aunque este aumento sólo resulta significativo en el caso del TNF α y a su vez la hCG parece disminuir la síntesis de estas citoquinas en ambos grupos [130]. Dentro del análisis del líquido folicular es interesante la determinación de MIC, pero como hemos comentado, el gran polimorfismo de la molécula y la baja sensibilidad de los métodos de detección recomiendan el análisis proteómico complementario. Cuando se realiza análisis proteómico del líquido folicular de mujeres normoovuladoras se encuentran al menos 27 puntos que no se corresponden con lo encontrado en el plasma. Además, se encuentran importantes concentraciones de reactantes de fase aguda incluyendo: transferrina, ceruloplasmina, afemina, hemopexina, haptoglobina y proteína amiloide α . Todo esto insiste en la idea ya expuesta de que la ovulación humana es un importante proceso inflamatorio. Por otra parte, en el análisis de líquido folicular se han encontrado importantes cantidades de

enzimas antioxidantes como: catalasa, superoxidodismutasa, glutathione transferasa, paroxonasa, HPS27 (proteína de daño térmico 27) y disulfidoisomerasa. Esto sugiere que durante la ovulación, el folículo humano está bien protegido del daño tóxico que el estrés oxidativo celular incrementado por el estado inflamatorio pudiese generar [131]. En este sentido cabe destacar que el estrés oxidativo producido por H_2O_2 induce la expresión de MICA y MICB la cual se puede detectar mediante PCR-RT semicuantitativa [132]. Por tanto, el desarrollo follicular requiere un equilibrio inmunológico del que depende la síntesis estrogénica que regula la ovulación y la maduración ovocitaria. En este equilibrio están implicadas moléculas inmunes como citoquinas y según nuestros resultados también MIC. El nuestro es el primer estudio que sepamos en el que se describe la presencia de MIC en el líquido folicular. Por el contrario, el origen de estas moléculas inmunes en el líquido folicular continúa siendo una incógnita. Algunos defienden que son producidas por linfocitos y macrófagos que migran al folículo durante la ovulación. Otros mantienen que no existen células inmunes en el folículo y tanto MIC como las citoquinas serían producidas entonces por las células de la granulosa. Este ambiente inflamatorio a nivel folicular parece aumentar el estrés oxidativo celular lo que es contrarrestado por una elevada concentración de antioxidantes endógenos a nivel del folículo. Se ha visto que este aumento del estrés oxidativo también aumenta la expresión de MIC. Sin embargo, no hemos encontrado asociación entre los distintos patrones de función ovárica y MIC. Creemos que esto podría deberse al polimorfismo de la molécula y a las bajas concentraciones en el líquido folicular, ya que al realizar análisis proteómico del mismo sí se observan claras diferencias entre distintos patrones de ovulación: SOP, donantes, normoovuladoras, endometriosis y baja reserva.

13. Polimorfismo de MIC

MIC es una molécula altamente polimórfica. Distintas isoformas de MIC parecen cumplir funciones completamente distintas. El alelo MICA-TMA4 se asocia con una mayor invasión ganglionar y menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal [133]. Otras isoformas de MICA, MICA 250 (rs1051794) se asocian con una mayor susceptibilidad de padecer artritis reumatoide que incluso es independiente de los alelos de riesgo de HLA-DRB1 [134]. Este polimorfismo dificulta enormemente el análisis. Se han descrito isoformas que sólo comparten un 27% de la secuencia de aminoácidos de cadena alfa ($\alpha1\alpha2\alpha3$) y que no son reconocidas por los anticuerpos utilizados habitualmente para ELISA que ni siquiera diferencian MICA de MICB [41]. Esto sugiere que aunque no se ha encontrado relación entre la expresión de MIC y la implantación, es posible que sí exista relación de determinadas isoformas y la tasa de implantación, pero para ello sería necesario utilizar luminex o PCR con las dificultades técnicas que esto conlleva.

14.Implicaciones éticas y jurídicas

El objetivo de la selección embrionaria es obtener un recién nacido sano en casa por cada ciclo de FIV iniciado. Existe el acuerdo, tanto entre clínicos como entre científicos dedicados a la Reproducción Asistida, de que el objetivo debe ser transferir un único embrión. Afortunadamente con las mejoras en las técnicas de laboratorio y sobretodo en crioconservación de los embriones, cada vez parece más factible transferir un único embrión sin disminuir significativamente las tasas de gestación evitando así los múltiples problemas derivados de las gestaciones múltiples [135]. Sin embargo, el decidir que embrión o embriones debe ser transferido tiene importantes implicaciones éticas y políticas ya que implica relegar a algunos embriones a investigación. En nuestro centro, a las parejas se las dan dos posibilidades para los embriones que no son transferidos: donarlos a otras parejas o donarlos a investigación. Esta segunda posibilidad es el origen de la mayor parte de los conflictos éticos en Reproducción Asistida. Dentro de la investigación con embriones, una de las aplicaciones más importantes es la obtención y utilización de células madre embrionarias. Las terapias celulares han surgido como un tratamiento revolucionario de múltiples patologías, especialmente de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, las células madre embrionarias son células derivadas de la masa celular interna de blastocistos en fase preimplantacional y su utilización supone la destrucción del embrión, lo que suscita problemas éticos en relación a:

1. El estado moral de formas incipientes de vida.
2. Complicidad por parte de las personas que con sus impuestos han financiado la investigación con embriones.
3. La protección de derechos humanos que para algunos incluye también el estadio embrionario.
4. El derecho a la libertad académica y de investigación.
5. La protección de los derechos de donantes de gametos y embriones.

En torno a estas cuestiones existe una gran polémica. Por una parte, las células embrionarias utilizadas sólo contienen células indiferenciadas, pluripotenciales que no han empezado aún el proceso de la organogénesis. No existen células neurales y por tanto no existe ningún estado de consciencia. Por otra parte, los que se oponen a la investigación con embriones sostienen que los embriones están completos genéticamente desde el inicio y tienen el potencial de desarrollar un niño por lo que deberían tener el status legal y moral de cualquier otro ser humano [136]. En algunos países como Alemania e Italia, la selección embrionaria no está permitida. En otros como España la legislación es más permisiva. Con el DGP (Diagnóstico Genético Preimplantacional) se pretende evitar que se transfieran embriones con enfermedades genéticas pero también permite la selección de características físicas o del sexo. En este último supuesto las implicaciones éticas son mucho mayores y además tiene repercusiones sociológicas. El concepto darwinista de embrión más fuerte o mayor capacidad de supervivencia puede ser discutible seleccionar embriones en función de las características físicas o del sexo, lejos de mejorar el rendimiento de las técnicas de reproducción asistida atenta contra la dignidad humana y puede acarrear problemas sociales importantes como el desequilibrio entre sexos [137]. A este respecto Ehrlich

sostiene que la selección embrionaria debe tener unas directrices claras y acordes a criterios unificados y consensuados por los profesionales dedicados a las técnicas de reproducción asistida, con la aprobación de los respectivos comités éticos y de acuerdo a la legislación vigente. En este sentido dejar a la autonomía individual de las parejas la decisión de los criterios de selección embrionaria resultaría, según lo expuesto, reproducible y peligroso [138]. Cuando en lugar de utilizar DGP se utilizan nuevos métodos bioquímicos no sólo para el despistaje de enfermedades sino para seleccionar embriones con mayores posibilidades de implantación las implicaciones éticas son aún mayores. En primer lugar este screening bioquímico preimplantacional “ideal” debería ser altamente sensible y por tanto con una mínima tasa de falsos negativos. De este modo se evitaría que un embrión sano y con altas posibilidades de implantación no fuese transferido y por tanto relegado a investigación o incluso destruido. Según nuestro estudio, la sensibilidad de MIC tanto en líquido folicular como en suero es extremadamente baja: 19 y 20%, con una tasa de falsos negativos considerablemente alta: 36% y 80%, por lo que no parece ser un buen método de screening preimplantacional. Un buen método de screening debe tener siempre una alta sensibilidad de modo que no se destruyan embriones con altas posibilidades de generar un recién nacido sano. La especificidad, aunque fue mayor (88 y 74%), no es suficiente como para justificar el empleo de MIC como screening preimplantacional. Pudiera tener relevancia clínica el hecho de que siendo MIC negativo, las posibilidades de implantación sean menores. Por otra parte, la expresión de MIC no se relaciona con la calidad embrionaria lo que apoya que no es éticamente justificable su empleo para seleccionar embriones, si bien las calidades embrionarias evaluadas según criterios morfológicos tampoco guardan una relación exacta con las tasas de implantación. Por tanto, el empleo de MIC para la selección embrionaria no estaría justificado

éticamente, si bien es posible que en el futuro, con el empleo de técnicas más sensibles y específicas de las distintas isoformas, la ausencia de expresión de MIC pueda ayudar a discriminar aquellos embriones con menores posibilidades de implantación. Por todo lo expuesto parece obvio que el objetivo deba ser la selección ovocitaria, de modo que sólo los ovocitos con mayores posibilidades fueran los fertilizados, para obviar la selección embrionaria y la hipotética destrucción de embriones. Según nuestro estudio MIC aporta poca información sobre la calidad embrionaria aunque sí aporta algo más de información sobre los ovocitos y la respuesta ovárica. Los resultados de MIC son prometedores a la hora de predecir el número total de ovocitos, pero para que se pudiese aplicar en la selección ovocitaria sería necesario poder individualizar la secreción de MIC de cada ovocito, lo que aunque es factible, constituye un nuevo reto por las dificultades técnicas que conlleva.

CONCLUSIONES

1. En el líquido folicular puede detectarse MIC en concentraciones similares a las plasmáticas. El origen de este MIC folicular continúa siendo desconocido.
2. A los 15 días de la transferencia embrionaria, los niveles plasmáticos detectados son superiores a los descritos previamente en mujeres fértiles.
3. La estimulación de la ovulación no parece alterar la expresión de MIC puesto que en receptoras de óvulos con ciclos sustituidos no presentan diferencias significativas frente a los ciclos estimulados.
4. No existe MIC soluble detectable en el sobrenadante de cultivo embrionario y, por tanto, no existe evidencia de que el embrión preimplantacional pueda sintetizar MIC.
5. Ni los niveles de MIC plasmáticos, ni los foliculares, se asocian a las tasas de implantación embrionaria. Por tanto, MIC no es un buen marcador de screening bioquímico preimplantacional.
6. Sin embargo, existe una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de MIC y la reserva ovárica. Pacientes con MIC sérica tienen un mayor número de ovocitos recuperados, mayor recuento de folículos antrales y menores niveles de FSH

basal. Por el contrario, los pacientes con expresión de MIC folicular, presentaron peor reserva ovárica con mayores niveles de FSH basal, menores niveles de estradiol y edades más avanzadas. Por todo ello, MIC se sugiere como un buen marcador de reserva ovárica y predictor de la respuesta a los tratamientos de estimulación con gonadotropinas.

7. Las pacientes con ovarios poliquísticos, normorrespondedoras y donantes, presentaron expresión de MIC sérica con mayor frecuencia que las pacientes con endometriosis y/o factor ovocitario.

8. La existencia de MIC folicular tiende a asociarse a una mayor proporción de embriones de primera categoría.

9. Dada el gran polimorfismo de MIC, el análisis proteómico folicular completa su estudio. Sin embargo, su similitud en cuanto a peso molecular con la albúmina hace que el SELDI-TOF no sea un buen método para aislar esta molécula.

10. Por el contrario, el análisis proteómico folicular revela que la expresión de MIC altera la expresión de otras proteínas que parecen estar también involucradas en la respuesta ovárica.

APÉNDICE

CONSENTIMIENTO INFORMADO

VALOR PREDICTIVO DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I EN LA RESPUESTA OVÁRICA Y EN LA INMUNOLOGÍA DE LA IMPLANTACIÓN

HOJA INFORMATIVA SOBRE EL ESTUDIO:

PROMOTORA E INVESTIGADORA PRINCIPAL: Dra Isabel Santillán Palencia

Usted va a formar parte de un estudio clínico. El objetivo de este estudio es encontrar marcadores bioquímicos que ayuden a mejorar el rendimiento de las técnicas de Reproducción Asistida. De este modo se podrían transferir en primer lugar los embriones con mayor capacidad de implantación, mejorando así los resultados de fecundación in vitro (FIV).

Por publicaciones recientes creemos que las proteínas relacionadas con el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MICA/B o MIC) podrían ser expresadas por el embrión de forma precoz. Estas moléculas intervendrían en la tolerancia inmunológica que permite la implantación.

Se pretende realizar un estudio prospectivo de los ciclos de FIV desde Noviembre 2008. En las punciones foliculares habitualmente se aíslan los ovocitos, desechándose el líquido folicular restante. Los embriones obtenidos con la FIV se mantienen en un medio de cultivo hasta que son transferidos. Una vez transferidos los embriones, este líquido también se desecha. Sin embargo algunas moléculas solubles como MICA/B (MIC) o HLA-G podrían detectarse ya en este medio.

El objetivo del estudio es precisamente analizar MIC en estos líquidos foliculares y sobrenadantes de cultivo embrionario que, de otro modo, se eliminarían. Además, se

realizaría también una determinación en suero utilizando la misma muestra de sangre que se toma para realizar la prueba de embarazo a los 15 días de la transferencia. Se utilizarán los siguientes datos de la historia clínica: número de historia, edad, factor de esterilidad, dosis total de FSH, número de folículos >18mm el día de la HCG, número de ovocitos por punción, REM, número de embriones obtenidos y tasa de gestación. En ningún caso figurará el nombre de la paciente.

Se trata de un estudio observacional y las pacientes no necesitarán ninguna exploración ni procedimiento adicional. Simplemente recibirán tratamiento habitual de estimulación de la ovulación para FIV. Las determinaciones se harán en sobrenadante de cultivo embrionario, líquido folicular y sangre. Estas determinaciones no afectan en absoluto al desarrollo embrionario.

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria y la no participación no supondrá ningún perjuicio para el paciente. El paciente podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin que esto suponga ningún perjuicio. Así mismo, se informará a las pacientes sobre datos relevantes del estudio que puedan influir en su decisión de continuar.

Siguiendo la normativa de la L.O.P.D. 15/1999 **todos los datos de la historia clínica y los obtenidos del estudio son absolutamente confidenciales.** Finalizado el estudio se procederá a la publicación de los resultados respetando siempre la confidencialidad de la paciente.

Dña..... y D.....

Mayores de edad, con domicilio en y
con DNI.....y.....

MANIFESTAMOS que tras haber sido debidamente informados de la finalidad del
proyecto de investigación

DONAMOS de forma libre y consciente el sobrenadante de cultivo embrionario, el
líquido folicular y la sangre (estos 2 últimos de
Doña.....) para dicho proyecto y su utilización del
mismo

COMPRENDEMOS:

-La hoja de información entregada y hemos podido preguntar a la Dra Santillán
todas las dudas al respecto.

-Que la participación es voluntaria y que podemos retirarnos del estudio en
cualquier momento sin que esto repercuta en nuestros cuidados médicos

PRESTAMOS libremente nuestra conformidad para participar en el estudio

FIRMA DE LOS PARTICIPANTES

FIRMA DEL INVESTIGADOR

En Madrid ade.....de 20....



Proyecto de investigación titulado: "VALOR PREDICTIVO DE LA HLA Y MIC EMBRIONARIOS EN RESULTADOS DE FIV".
Código HULP: PI-600

**D^a Dolores Jiménez Heranz, Secretaria del
Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario "La Paz" de Madrid,**

HACE CONSTAR QUE:

1º En la reunión celebrada el día 07 de noviembre de 2007, acta 21/2007, se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.

2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 223/2004 y Decreto 39/94 de la Comunidad de Madrid -para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º El CEIC del Hospital La Paz, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

4º La composición actual del CEIC del Hospital La Paz es la siguiente:

Dr. Antonio Gil Aguado, Jefe de Sección de Medicina Interna, Presidente
Dr. Jesús Frías Iniesta, Jefe de Servicio de Farmacología Clínica, Vicepresidente
D^a Dolores Jiménez Heranz, Licenciada en Derecho, Secretaria
Dr. Mario Arancón Monge, Médico de Atención Primaria, Vocal
Dr. Javier Arpa Gutiérrez, Jefe de Sección de Neurología, Vocal
Dr. Manuel Jiménez Lendínez, Jefe de Servicio de Medicina Intensiva, Vocal
Dr. Carlos A. Hernández Gil, Médico Adjunto de Traumatología, Vocal
Dr. Antonio Buño Soto, Médico Adjunto del Laboratorio de Urgencias, Vocal
Dr. Jaime Feliú Batlle, Médico Adjunto de Oncología, Vocal
Dra. Elena García Higuera, Médico Adjunto de Anestesia, Vocal
Dr. Fernando Cabañas González, Médico Adjunto de Neonatología, Vocal
D. Filiberto Chuliá, Licenciado en Derecho, Vocal
D^a Rosario Madero Jarabo, Adjunto de Bioestadística, Vocal
D^a Elena Villamañán, Farmacéutica Adjunta. Servicio de Farmacia, Vocal
D^a Dolores Álvarez Alonso, Enfermera de C.I.N., Vocal
D^a Teresa González de Benito, Licenciada en Filosofía y Ciencias de la Educación, Vocal
D. Juan A. Sánchez-Moreno Mínguez, Licenciado en Derecho, Vocal y Ajeno al Hospital
Dr. Rodolfo Álvarez-Sala Walther, Jefe de Sección de Neumología, Vocal
Dr. Luis Asensio Prianes, Médico Adjunto. Servicio de Cirugía General
Dra. Almudena Castro Conde, Médico Adjunto. Servicio de Cardiología

Para que conste donde proceda, y a petición del investigador

Madrid a 07 de noviembre de 2007

Fdo: Dolores Jiménez Heranz



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Antonio Gil Aguado, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del investigador, la Dra. Isabel Santillán Palencia del Servicio de Ginecología del Hospital Maternal, para que se realice el proyecto de investigación titulado 'VALOR PREDICTIVO DE LA HLA Y MIC EMBRIONARIOS EN RESULTADOS DE FIV', código HULP: PI-600,

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado por la Dra. Isabel Santillán Palencia del Servicio de Ginecología del Hospital Maternal, como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 7 de noviembre de 2007

Firmado: Don Antonio Gil Aguado



Hospital Universitario La Paz
Fundación para la Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



**LA DIRECTORA DE LA FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "LA PAZ"**

CERTIFICA:

Que **Dña. Isabel Paloma Santillán Palencia**, con **DNI.: 01187218G**, del **Servicio de Ginecología y Obstetricia** fue beneficiaria de las "Ayudas Aplicación Clínica 2008" concedidas por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario "La Paz".

Y para que conste, a petición del interesado, se expide la presente en Madrid, a Dieciséis de Febrero de dos mil Once.

DIRECTORA DE FIBHULP

Fdo.: Dña. Ana Coloma Zapatero

Fundación para la Investigación
Biomédica del Hospital Universitario
LA PAZ
G-83727057

Pº Castellana 261
28046 Madrid
Tel: 91 727 75 76
Fax: 91 207 10 61
E-mail: fundacion.hulp@salud.madrid.org

El proyecto de esta tesis doctoral fue presentado en el workshop organizado por **EMBIC** en Oxford en Junio de 2008 y como ponencia en el **I SIMPOSIO EUROFORUM- MONTEPRINCIPE** en Octubre 2008.



Los resultados preliminares de esta tesis doctoral fueron presentados como comunicación oral **ELEVADA A PONENCIA** en el **7º Congreso Europeo de Inmunología de la Reproducción (ESRI 2009)** obteniendo un premio-beca.



Los resultados preliminares de esta tesis doctoral fueron presentados y aceptados como poster oral en el **XI Congreso Internacional de Inmunología de la Reproducción (ICRI 2010)** obteniendo un premio-beca.



Los resultados preliminares de esta tesis doctoral fueron presentados y aceptados como poster en el **XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF 2010)**, en el **8º Congreso Europeo de Inmunología de la Reproducción (ESRI 2010)** y en **31 Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia (SEGO 2011)**.



CERTIFICADO DE PRESENTACIÓN DE COMUNICACIÓN

XXVIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD
Valencia 19, 20 y 21 de mayo de 2010

Comunicación *P-0099*

LOS NIVELES DE SMIC EN SUERO ESTAN INDUCIDOS POR LOS NIVELES DE ESTRÓGENOS Y SE RELACIONAN CON LA RESPUESTA OVÁRICA

Tipo de presentación Borrador

Área Implantación

Autores

Presentador	Autor	Nombre	Primer apellido	Segundo apellido
1	1	ISABEL	SANTILLAN	PALENCIA
	2	VICTORIA	VERDU	
	3	RUT	GOMEZ DE SEGURA	
	4	MARIA	RUIZ	
	5	LORETO	LOPEZ	
	6	MAROLLA	PARRA	
	7	VICENTE	BADARIZ	
	8	JOSE MANUEL	BAJO ARENAS	

Y para que conste donde convenga, firmamos el presente en Valencia a 19 de mayo de 2010.

OPC CONGRESS S.L.

CIF: 46023454
C/ Escalier Oriben Vicent, 3 Esc. II - pta 3
46023 VALENCIA
Tel: 96 328 65 00 - Fax: 96 328 65 01



La secretaria técnica



Secretaria Técnica: OPC Congress S.L. - C/ Escalier Oriben Vicent, 3 - 46023 Valencia
 Tel: 96 328 65 00 - Fax: 96 328 65 01
info@opccongress.com
www.sef2010.com

BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzalez R, Quintana J, Campos I, Magán R, Ballesteros A. Estudio de la mujer esteril. En Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A, editores. Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. 3ª ed. Madrid: Mc Graw Hill 2008; 1-9.

2. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroy P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. Hum Reprod Update 2008; 605-621.

3. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the black box of early pregnancy loss. Hum Reprod Update 2002; 333-343.

4. Min JK, Breheny SA, Maclachlan V. What is the most relevant standard of success, the singleton term gestation, live birth rate per cycle initiated: the BESST endpoint for assisted reproduction. Hum Reprod 2004; 3-7.

5. Riley JK. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance. Immunol Invest 2008; 395-426.

6. Carosella ED. HLA-G: from fetomaternal tolerance to organ graftin. Bull Mem Acad R Med Belg 2009; 87-99.

7. Kajikawa M, Baba T, Tomaru U, Watanabe Y, Koganei S, Tsuji-Kawahara S et al. MHC Class I-like MILL Molecules are β 2 Microglobulin Associated, GPI-anchored Glycoproteins that do not require TAP for Cell Surface Expresión. J Immunol 2006; 3108-3115.

8. Aquino-Galvez A, Perez-Rodríguez M, Camarena A, Falfan-Valencia R, Ruiz V, Montañó M et al. MICA polymorphism and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Hum Genet* 2009; 639-648.

9. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 2000; 1-60.

10. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *PNAS* 1993; 12445-12450.

11. Nüchel H, Switala M, Sellman L, Horn PA, Düring J, Dührsen U et al. The prognosis significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010; 1152-1159.

12. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 727-729.

13. Luo L, Lu J, Wei L, Long D, Guo JY, Shan J et al. The role of HIF-1 in up-regulating MIC expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. *BMC cell Biol* 2010; 11-91.

14. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddle SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 255-260.

15. Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A et al. Binding of *Escherichia coli* adhesion AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I related molecule MICA. *PNAS* 1999; 2977-2982.

16. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V et al. Critical role of MHC Class I-related chain A and B expression on INF- α stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 1249-1256.

17. Li Y, Xia B, Lü M, Ge L, Zhang X. MICB0106 gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in central China. *Int J Colorectal Dis* 2010; 153-159.

18. Rebmann V, Schütt P, Brandhorst D, Opalka B, Moritz T. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol* 2007; 114-120.

19. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG et al. Functional expresión and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leucemia. *Blood* 2003; 1389-1396.

20. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumour-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Immunology* 1999; 6879-6884.

21. Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA, Arase H, Houchins JP, Mocarski ES. NKG2D-mediated Natural Killer Cell protection against Cytomegalovirus is impaired

by viral GP40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 2003; 1245-1253.

22. Tamaki S, Kawakami M, Yamanaka Y, Shimomura H, Imai Y, Yamamoto K et al. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Immunol* 2009; 331-337.
-

23. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic Release of Soluble UL16-Binding Protein 2 from Tumor Cells. *Cancer Res* 2006; 2520-2526.
-

24. Mincheva-Nilson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U. Placenta Derived Soluble MHC Class I Chain-Related Molecules Down-Regulate NKG2D Receptor on Peripheral Blood Mononuclear Cells during Human Pregnancy: A Possible Novel Immune Escape Mechanism for Fetal Survival. *J Immunol* 2006; 3585-3592.
-

25. Farsad K. Exosomes: novel organelles implicated in immunomodulation and apoptosis. *Yale J Biol Med* 2002; 95-101.
-

26. Porcu-Buisson G, Lambert M, Lyonnet L, Loundou A, Gamberre M, Chamoin-lau et al. Soluble MHC Class I chain-related molecule serum levels are predictive markers of implantation failure and successful term pregnancies following IVF. *Hum Reprod* 2007; 1-6.
-

27. Fürst D, Solgi G, Recker K, Mytilineos D, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Tissue Antigens 2011; 201-205.

28. Wucherpennig KW, Sethi D. T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity. *Sem Immunol* 2011; 84-91.
-
29. Beck S, Geraghty D, Inoko H, Rowen L. Complete sequence and gene map of Human Major Histocompatibility Complex. *Nature* 1999; 921-923.
-
30. Hess AD, Thoburn CJ, Chen W, Bright AE. Unexpected T-cell diversity in syngeneic graft-versus-host disease revealed by interaction with peptide-loaded soluble MHC class II molecules 1999. *Transplantation* 2003; 1361-1367.
-
31. Kajikawa M, Baba T, Tomaru U, Watanabe Y, Koganei S, Tsuji-Kawahara S et al. MHC Class I-like MILL Molecules are β 2 Microglobulin Associated, GPI-anchored Glycoproteins that do not require TAP for Cell Surface Expression. *J Immunol* 2006; 3108-3115.
-
32. Sconocchia G, Spagnoli GC, Del Principe D, Ferrone S, Anselmo M. Defective Infiltration of Natural Killer Cells in MICA/B Positive Renal Cell Carcinoma Involves β 2Integrin Mediated Interaction. *Neoplasia* 2009; 662-671.
-
33. Martinez E, Brzustowski JA, Long EO, Gross CG. Cutting Edge: NKG2D-Dependent Cytotoxicity is controlled by ligand distribution in target cell membrane. *J Immunol* 2011; 5538-5542.
-
34. Resino S. Genética del MHC. *EMEI* 2009; 1-2.
-

35. Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW. The activating NKG2D receptor assembles in the membrana with two signaling dimers into a hexameric structure. *PNAS* 2005; 7641-7646.
-
36. Roda-Navarro P, Reyburn HT. The traffic of the NKG2D/Dap10 receptor complex during natural killer (NK) cell activation. *J Biol Chem* 2009; 16434-16472.
-
37. Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligands expressing tumor cells. *Blood* 2005; 1711-1717.
-
38. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Pinopode expresión during human implantation. *Eur J Obstet and Gynaecol* 2002; 104-108.
-
39. Xu B, Geerts D, Qian K, Zhang H, Zhu G. Myeloid ecotropic viral integration site 1 (MEIS) 1 involvement in embryonic implantation. *Hum Reprod* 2008; 1394-1406.
-
40. Jia-Ron Z, Shuang Di L, Xiao-Ping W. Eutopic or ectopic pregnancy: a competition between signals derived from the endometrium and the fallopian tube for blastocyst implantation. *Placenta* 2009; 335-339.
-
41. Hess AP, Baston-Buest DM, Schanz A, Hirschenhain J, Bielfeld P, Kruessel JS. Interleukin 1 system in the fallopian tube-No spatial but temporal regulation of mRNA and protein expression. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 7-12.
-

42. Emmer PM, Steegers EA, Kerstens HM, Bulten J, Neelen WL, Boer K et al. Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and the decidual natural killer cells in the pathological pregnancies. *Human Reprod* 2002; 1072-1080.
-

43. Ocimen EE, Kiyici H, Uckuyu A, Yanik FF. Are CD57+ Natural Killer cells really important in early pregnancy failure? *Arch Gynecol and Obstet* 2009; 493-497.
-

44. Ordi J, Casals G, Ferrer B, Creus M, Guix C et al. Uterine (CD56) natural killer cell recruitment: association with decidual reaction rather than embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 2006; 369-377.
-

45. Aplin JD, Mesequer M, Simon C, Ortiz C, Croxatto H, Jones CJ. MUC 1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001; 153-156.
-

46. Kira-Safran C, D'Souza SS, Carson D. Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Sem Cell Dev Biol* 2008; 187-193.
-

47. Staun-Raum E, Shalev E. Human Trophoblast function during implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 1477-7827.
-

48. Van den Brûle F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C et al. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanism and regulation. In Markert UR, editor. *Immunology of Gametes and Embryo Implantation*. 1^a ed. Basilea: Kager 2005; 163-180.
-

49. Balbin M, Fueyo A, Knäuper V, López JM, Alvarez J, Sanchez LM et al. Identification and Enzimatic Characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 10253-10262.
-
50. Adhajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 176-183.
-
51. Lim HJ, Dey SK. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* 2009; 619-626.
-
52. Bamberger AM, Sudahl S, Löning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P et al. The adhesion molecule CEACAM 1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol* 2000; 1165-1170.
-
53. Makriagiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Chrousos G. Endometrial and Placental CRH as regulators of human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2004; 53-59.
-
54. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B. HLA-G expresión in early embryos is fundamental prerequisite for obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002; 311-315.
-
55. Van Lierop MJC, Wijnands F, Loke YW, Emmer PM, Lukassen HGM, Bratt DDM et al. Detection of HLA-G by specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 2002; 776-784.

56. Hiby SE, King A, Sharkey A, Loke YW. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 1999; 1-13.
-
57. Zhāng Q, Cecka JM, Gjertson DW, Ge P, Rose ML, Patel JK et al. HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation* 2011; 1153-1158.
-
58. Chaouat G, Ledée-Bataille N, Chea KB, Dubanchet S. Cytokines and Implantation. En Markert UR, editor. *Immunology of Gametes and Embryo Implantation*. 1^a ed. Basilea: Kager 2005; 38-39.
-
59. Evans J, Catalana RD, Brown P, Sherwing R, Critchley OD, Fazleabas AT et al. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 2009; 2165-2175.
-
60. Adhajanova L. Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 213-219.
-
61. Serafin PC, Silva IDCG, Smith GD, Motta ELA, Rocha AM, Baracat EC et al. Endometrial Claudin-4 and Leukemia Inhibitory Factor are associated with assisted reproductive outcome. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 1477-7827.
-
62. Revelli A, Piane LD, Casano S, Molina E, Massobrio M. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical marker to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 1477-7827.

63. Roberts RM. Interferon tau a type 1 Interferon involved in Maternal Recognition of Pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 403-408.
-
64. Chon TW, Bixler S. Interferon-tau: current applications and potential in antiviral therapy. *J Interferon Cytokines Res* 2010; 477-485.
-
65. Apps R, Gardner L, Hiby SE, Sharkey AM, Moffett A. Conformation of human leucocyte antigen G molecules at the surface of human trophoblast cells. *Immunology* 2008; 322-328.
-
66. Münz C, Holmes N, King A, Loke YW, Colonna M, Child et al. Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G Molecules Inhibit NKAT3 Expressing Natural Killer Cells. *J Exp Med* 1997; 385–391.
-
67. Warner C, Comiskey M, Clisham PR, Brenner CA. Soluble HLA-G (HLA-Gs) a predictor of IVF outcome? *J Assist Reprod Genet* 2004; 315-316.
-
68. Jurisicova A, Casper RF, Maclusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expresión during preimplantational human embryo development. *PNAS* 1996; 161-165.
-
69. Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L. Non-Classic sHLA-I in Human oocyte culture médium. *Hum Immunol* 1999; 1054-1057.
-
70. Nocchi I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potencial embryos. *Hum Reprod* 2005; 138-141.

71. Sher G, Keskindepe L, Fisch J, Acacio B. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours of fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2005; 1410-1413.
-
72. Sageshima N, Shobu T, Kawai K, Hashimoto H, Yamashita M. Soluble HLA-G is absent from human embryo cultures: A reassessment of sHLA-G detection methods. *J Reprod Immunol* 2007; 11-22.
-
73. Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H et al: Rapid Evaluation of Soluble HLA-G Levels in Supernatants of in Vitro Fertilized Embryos. *Hum Immunol* 2007; 251-258.
-
74. Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. HLA-G Expression is a Fundamental Prerequisite to Pregnancy. *Hum Immunol* 2007; 244-250.
75. Hamatani T, Ko MSH, Yamada M, Kuji N, Mizusawa Y, Shoji M et al. Global gene expression profiling of preimplantational embryos. *Hum Cell* 2006; 98-117.
-
76. Quenby S, Farquharson R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2006; 24-28.
-
77. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and In Vitro Fertilization Sperm Injection outcome. En Markert UR, editor. *Immunology of Gametes and Embryo Implantation*. Kager 1^a Ed. Basilea 2005; 80-97.
-

78. Kane N, Nelly R, Saunders PTK, Critchley HOD. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by hCG and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 2009; 2882-2888.
-
79. Colantonio AD, Bimber BN, Neidermyer WJJ, Reeves RK, Alter G, Altfeld M et al. KIR polymorphism modulate peptide-dependent binding to an MHC class I ligand with a Bw6 motif. *PLoS Pathog* 2011; 1-13.
-
80. Ge LQ, Jiang T, Zhao J, Chen ZT, Zhou F, Xia B. Upregulated mRNA expression of major histocompatibility complex class I chain related gene A in colon and activated natural killer cells of Chinese patients with ulcerative colitis. *J Dig Dis* 2011; 82-89.
-
81. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond stressed self. Evidence for NKG2D ligand. Expresión on healthy cells. *Curr Immunology Rev* 2009; 22-34.
-
82. Paus R, Slominski A, Czarnecki BM. Is alopecia areata an autoimmune-response agonist melanogenesis-related proteins exposed by abnormal MHC Class I expression in the anagen hair bulb? *J Biol Med* 1994; 541-554.
-
83. Glas J, Martin K, Brännler G, Kopp R, Folwaczny C, Weiss EH et al. MICA, MICB and C1-4-1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001; 243-249.
-
84. Fionda C, Soriani A, Malgarini G, Iannitto ML, Santoni A, Cippitelli M. Heat shock protein-90 inhibitors increase MHC class I related chain A and B ligands expression on

multiple myeloma cells and their ability to trigger NK cell degranulation. *J Immunol* 2009; 4385-4394.

85. Moenkemeyer M, Heiken H, Schmidt TRE, Witte T. Higher risk of cytomegalovirus reactivation in human immunodeficiency virus-1 infected patients homozygous for MICA 5.1. *Hum Immunol* 2009; 175-178.
-

86. Guillotou F, de Thouel A, Jean C, Demur C, Mansat-De Mas V, Laurent G et al. TNF alpha stimulates NKG2D-mediated lytic activity of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2005; 2206-2214.
-

87. Bai SX, Wang YL, Qiu L, Xiao ZJ, Herva R, Piao YS. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction* 2005; 103-113.
-

88. Corry GN, Tancsijevic B, Barri ER, Krueger W, Rasmussen TP. Epigenetic regulatory mechanism during preimplantational development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 297-313.
-

89. Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Mitogen-Activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 2002; 2221-2232.
-

90. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, Velde ER et al. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002; 328-336.
-
91. Wang JQ, Douglas NC, Nakhuda GS, Choi JM, park SJ, Thornton MH et al. The association between anti-Müllerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age. *Reprod BioMed Online* 2010; 757-761.
-
92. Tian W, Cai J, Liu X MICA genetic polymorphism and HLA-A, C, B, MICA and DRB1 haplotypic variation in southern Chinese Hem population. Identification of two new MICA alleles, MICA*060 and MICA*062. *Hum Immunol* 2011, 510-515.
-
93. Conaghan J, Hardy K, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet* 1993; 21-30.
-
94. Aydiner F, Yetkin CE, Seli E. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Curr Mol Med* 2010; 206-215.
-
95. Piccinni MP, T cell tolerance towards the fetal allograft. *Journal of Reproductive Immunology* 2010; 71-75.
-
96. Joshi M, Dindelegan G, Olausson M, Oltean M. Natural killer group 2 member D cell recruitment driven by major histocompatibility complex class I chain related antigens A and B: a possible mechanism during acute intestinal allograft rejection in the mouse. *Transpl Proc* 2010; 4467-4469.

97. Rizzo R, Dal Canto MB, Stignani M, Fadini R, Fumagalli D, Reuzini M. Production of sHLA-G molecules by in vitro matured cumulus-oocyte complex. *Int J Mol Med* 2009; 523-530.
-
98. Rogers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 2010; 1021-1029.
99. Canti-Laird E, Carré GA, Mandon-Pepin B, Kadler KE, Fabre S. First evidence of bone morphogenetic protein 1 expression and activity in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod* 2010; 138-146.
-
100. Nolting A, Dugast AS, Rihn S, Luteijn R, Carrington MF, Kane K, et al. MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction. *Virology* 2010; 12-20.
-
101. Li L, Chen A, Chaudhuri A, Kambham N, Sigdel T, Chen R, et al. Compartmental localization and clinical relevance of MICA antibodies after renal transplantation. *Transplantation* 2010; 312-319.
-
102. Santos MA, Kuijk EW, Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction* 2010; 23-34.
-
103. Teklenburg G, Salker M, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanpong T et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PloS One* 2010; 1-6.
-

104.Latham KE. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int Rev Cytol* 1999; 71-124.

105.Bartolomei MS. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev* 2009; 2124-2133.

106.Bell CE, Calder MD, Watson AJ. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol Hum Reprod* 2008; 691-701.

107.Janny L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994; 36-42.

108.Crespo D, Bonnet E, Roher N, Mackenzie SA, Krasnov A, Goetz FN. Cellular and molecular evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in the ovulatory mechanism of trout. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8-14.

109.Sun W, Stegmann BJ, Henne M, Catherino WH, Segars JH. A new approach to ovarian reserve testing. *Fertil and Steril* 2008; 2196-2202.

110.Neal MS, Reade CJ, Younglai EV, Holloway AC, Goodrow GJ. Granulosa cell aromatase activity in women undergoing IVF: a comparison of good and poor responders. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2008; 138-142.

111.Grimaldi CM, Jeganathan V, Diamond B. Hormonal regulation of B cell development: 17 beta-estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J Immunol* 2006; 2703-2710.

112.Mjösberg J, Svensson J, Johansson E, Hellström L, Casas R, Jenna MC et al. Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ T regs in human second trimester pregnancy is induce by progesterone and 17beta-estradiol. J Immunol 2009; 759-769.

113.Waters EM, Simerly RB. Estrogen induces caspase-dependent cell death during hypothalamic development. J Neurosci 2009; 9714-9718.

114.Blois SM, Llarregi JM, Tonetten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. Nat Med 2007; 1450-1457.

115.Than NG, Romero R, Erez O, Weckle A, Tarca AL, Hotra J et al. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. PNAS USA 2008; 15819- 15824.

116.Merino P, Schulin-Zeuthen C, Codner E. Diagnóstico del síndrome del ovario poliquístico: nuevos fenotipos, nuevas incógnitas. Rev Med Chil 2009; 1071-1080.

117.Stilley JAW, Woods-Marshall R, Sutovsky M, Sutovsky P, Sharpe-Timms KL. Reduced fecundity in female rats with surgically induced endometriosis and in their daughters: a potential role for tissue inhibitors of metalloproteinase 1. Biol Reprod 2009; 649-656.

118.Papageorgiou, Guibert J, Goffinet F, Patrat C, Fulla Y, Janssens Y et al. Percentile curves of serum estradiol levels during controlled ovarian stimulation in 905 cycles stimulated with recombinant FSH show that high estradiol is not detrimental to IVF outcome. Hum Reprod 2002; 2846-2850.

119.Kyrou D, Popovic-Todorovic B, Fatemi HM, Bourgain C, Haentjens P, Van Landuyt L et al. Does the estradiol level on the day of human chorionic gonadotrophin administration have an impact on pregnancy rates in patients treated with rec-FSH/GnRH antagonist? *Hum Reprod* 2009; 2902-2909.

120.Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ et al. Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2009; 13-29.

121.Liu J, Lee K, Ng EHY, Yeung WSB, Ho P. Gene expression profiling of human periimplantation endometrial between natural and stimulated cycles. *Fertil Steril* 2008; 2152-2164.

122.Paiva P, Menkhorst E, Salamonsen L, Dimitriadis E. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine & Growth Factor Rev*; 319-328.

123.Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom, K. Identification of the nonclassical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 268-277.

124.Liu S, Jiang JJ, Feng HL, Ma SY, Li M, Li Y. Evaluation of the immature human oocytes from unstimulated cycles in polycystic ovary syndrome patients using a novel scoring system. *Fertil Steril* 2010; 2202-2209.

125. Rubio C, Mercader A, Alamá P, Lizán C, Rodrigo L, Labarta E et al. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod* 2010; 2290-2297.

126. Jarkovska K, Martinkova J, Liskova L, Halada P, Moos J, Rezabek K et al. Proteome mining of human follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological pathways in women undergoing in vitro fertilization. *J Proteome Res* 2010; 1289-1301.

127. Harath S, Willians EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryan CE et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* 2007; 683-693

128. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 2004; 40-52.

129. Sartini D, Moussawi M, Salam R, Bernstein I, Huber S. Correlation between serum estradiol in the follicular phase of the ovarian cycle and decay acceleration factor (DAF) expression on red blood cells and Cocksakie virus B-3 induced hemagglutination in young cycling women. *Am J Reprod Immunol* 2004; 180-187.

130. Carlberg M, Nejaty J, Fröysa B, Guan Y, Söder O, Bergqvist A et al. Elevated expression of tumour necrosis factor α in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2000; 1250-1255.

131. Angelucci S, Ciavarelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpicio M, Tiboni GM et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1775-1785.

132. Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Hidetoshi O et al. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in human colon carcinoma cell line (CaCa-2). *Biochim Biophys Acta* 2001; 10-12.

133. Kopp R, Glas J, Lau-Werner U, Albert ED, Weiss EH. Association of MICA-TM and MICB C1-2-A. Microsatellite Polymorphism with tumor Progression in Patients with Colorectal Cancer. *J Clin Immunol* 2009; 545-554.

134. Kirsten H, Petit-Teixeira E, Scholz M, Hasendeuer D, Hautmann H. Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study. *Arthritis Res Ther* 2009; 1-11.

135. Devroy P, Fauser BCJM, Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update* 2009; 391-408.

136. Raval AN, Kamp TJ, Hogle LF. Cellular therapies for heart disease: unveiling the ethical and public policy challenges. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 593-601.

137. O'Mathuna DP. Human dignity in the Nazi era: implications for contemporary bioethics. *BMC Med Ethics* 2006; 1-2.

138. Ehric K, Williams C, Farsides B, Sandall J, Scott R. Choosing embryos: ethical complexity and relational autonomy in staff accounts of PGD. *Sociol Health Illn* 2007; 1091-1106.
-
-

